

**GLOBÁLIS AGYI ISCHAEMIA HATÁSA KÉT
KÜLÖNBÖZŐ PATKÁNYTÖRZS KÉRG
AKTIVITÁSÁRA ÉS EGY ÚJ LEHETSÉGES
NEUROPROTEKTÍV STRATÉGIA TESZTELÉSE**

PH.D. ÉRTEKEZÉS

Fuzik János

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

ÉLETTANI SZERVEZETTANI ÉS IDEGTUDOMÁNYI
TANSZÉK

TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

2012

Szeged

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	4
1. Bevezetés	5
1.1 Az agyérkatasztrófák jelentősége és típusai	5
1.2 A kutatásban alkalmazott ischaemiás állatmodellek	7
1.3 A Wistar és a Sprague-Dawley patkánytörzsek és kísérleti alkalmazhatóságuk.....	9
1.4 Az ischaemiát követő folyamatok időbelisége.....	12
1.5 A glutamát és a programozott sejthalál	13
1.6 A glutamát scavenging élettani alapjai	15
1.7 A DHEA mint endogén neuroprotektív neuroszteroid	16
1.8 A szinaptikus plaszticitás és az LTP	19
2. Célkitűzés.....	23
3. Anyagok és módszerek	24
3.1 Felhasznált állatok	24
3.2 A 4VO ischaemiás modell	24
3.3 Hatóanyagok dozírozása, kezelés	26
3.4 <i>In vivo</i> elektrofiziológia.....	27
3.5 <i>In vitro</i> elektrofiziológia	28
3.6 Hisztológia	29
3.7 Adatelemzés	31
3.7.1 BSR analízis	31
3.7.2 Küszöb feletti kérgi aktivitás számszerűsítése	33
3.7.3 Frekvencia-komponensek teljesítmény spektruma.....	33
3.7.4 Statisztikai analízis	34
4. Eredmények.....	35
4.1 A Wistar és az Sprague-Dawley törzsek jellegzetes kérgi aktivitása ischaemia alatt és után	35
4.1.1 BSR analízis	36
4.1.2 Küszöb feletti kérgi aktivitás számszerűsítése	39
4.1.3 A frekvencia komponensek teljesítmény-spektruma	40
4.1.4 Hisztológiai eredmények	43
4.2 Az oxálecetsavval és DHEA-val végzett kombinált kezelések.....	46

4.2.1 <i>In vitro</i> elektrofiziológiai eredmények	46
4.2.1.1 A 4VO hatása az LTP kiválthatóságára.....	47
4.2.1.2 Az oxálecetsav hatása a 4VO állatok szinaptikus plaszticitására.....	48
4.2.1.3 A DHEA hatása 4VO állatok szinaptikus plaszticitására	49
4.2.1.4 Az oxálecetsav és a DHEA kombinált kezelés hatása a 4VO állatok szinaptikus plaszticitására.....	50
4.2.1.5 Az I/O görbék	51
4.2.2 <i>In vivo</i> elektrofiziológiai eredmények	53
4.2.2.1 BSR analízis.....	53
4.2.2.2 Küszöb feletti kérgi aktivitás számszerűsítése	54
4.2.2.3 Frekvencia-komponensek teljesítmény spektruma	55
5. Diskusszió.....	57
6. Összefoglaló	66
7. Summary	69
Köszönetnyilvánítás	71
Irodalomjegyzék	72
Tudományos közlemények jegyzéke	82

Rövidítések jegyzéke

- 2VO: 2 ér elzárás (2-vessel occlusion)
- 4VO: 4 ér elzárás (4-vessel occlusion)
- ACA: arteria cerebialis anterior (anterior cerebral artery)
- AMPA: α -amino-3-hidroxi-5-methylisoxazol-4-propionát
- BA: arteria basilaris (basilar artery)
- CA1: Ammon szarv 1-es régió (cornu ammon 1)
- CBF: nagyagyi vérellátottság (cerebral blood flow)
- CCA: arteria carotis communis (common carotid artery)
- COX: ciklooxygenáz (cyclooxygenase)
- CSF: cerebrospinális folyadék (cerebrospinal fluid)
- CREB: cAMP respond element binding
- DHEA: dehidroepiandrosteron
- DHEAS: dehidroepiandrosteron-szulfát
- DPCPX: 1,3-dipropil-8-ciclopentilxantin
- EAAT: excitatórikus aminosav transzporter (excitatory amino acid transporter)
- ECA: arteria carotis externa (external carotid artery)
- ECoG: elektrokortikogram
- EPSP: serkentő posztzinaptikus potenciál (excitatory postsynaptic potential)
- fEPSP: mező-EPSP (field-EPSP)
- FB: az első megjelenő tüzelés (first burst)
- GABA: γ -amino-vajsav (gamma aminobutyric acid)
- Glu: glutamát
- GOT: glutamát-oxálecetsav transzamináz (glutamate-oxaloacetate transaminase)
- HFS: nagy frekvenciás ingerlés (high frequency stimulation)
- ICA: arteria carotis interna (internal carotid artery)
- IL-1: interleukin-1 (interleukin-1)
- I/O: bemenet/kimenet (input/output)
- ISF: intersticiális folyadék (interstitial fluid)
- LTP: szinaptikus áttevődés hatékonyságának tartós megnövekedése (long term potentiation)
- MMP: mátrix metalloproteáz (matrix metalloprotease)
- NF- κ B: („nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells”)
- NOS: nitrogén-oxid-szintetáz (nitrogen oxide synthetase)
- NMDA: N-metil-D-aszpartát
- OA: arteria occipitalis (occipital artery)
- OFR: oxigén szabadgyök (oxygen free radical)
- OxAc: oxálecetsav (oxaloacetate)
- PCA: arteria cerebialis posterior (posterior cerebral artery)
- PKA: protein kináz A (protein kinase A)
- PKC: protein kináz C (protein kinase C)
- PLA2: foszfolipáz-A2 (phospholipase-A2)
- PPD: páros impulzus depresszió (paired pulse depression)
- PPF: páros impulzus facilitáció (paired pulse facilitation)
- PTP: poszt-tetanusos potenciálozódás (post tetanic potentiation)
- PSD: posztzinaptikus denzitás (postsynaptic density)
- SD: Sprague-Dawley
- ST: arteria thyroidea superior (superior thyroid artery)
- TBS: téta ritmussal való ingerlés (theta burst stimulation)
- TIA: tranziens ischaemiás esemény (transient ischemic attack)

1. Bevezetés

1.1 Az agyérkatasztrófák jelentősége és típusai

A halálesetek évenkénti száma 60 millióhoz közelít a világon, amelyek 60 %-át valamilyen nem fertőző betegség okozza. Ezeknek felét a kardiovaszkuláris rendszer megbetegedései teszik ki (Mathers és mtsai., 2009).

A gazdasági helyzet szerinti országcsoportokban a vezető halálokok meglehetősen eltérnek egymástól, azonban valamennyi országcsoportban az első öt halálokok között szerepelnek az agyi-, és koszorúér-betegségek. Jellemzően az alacsony jövedelmű országokban van nagy szerepe a halálozásban a HIV-vírusnak, a különböző hasmenéses betegségeknek, az újszülöttkori fertőzéseknek, a szülés körüli halálozásnak és a maláriának. A közepes jövedelmű országokban nagyon magas a közlekedési balesetekben elhunytak száma, a magas jövedelmű országokban pedig rendkívül sokan halnak meg rosszindulatú daganatos és különböző öregkori neurodegeneratív betegségekben. Ez utóbbi abból is fakad, hogy az elhunytak 85 %-a 60 év feletti, vagyis jóval magasabb az átlagéletkor (Mukherjee és mtsai., 2011).

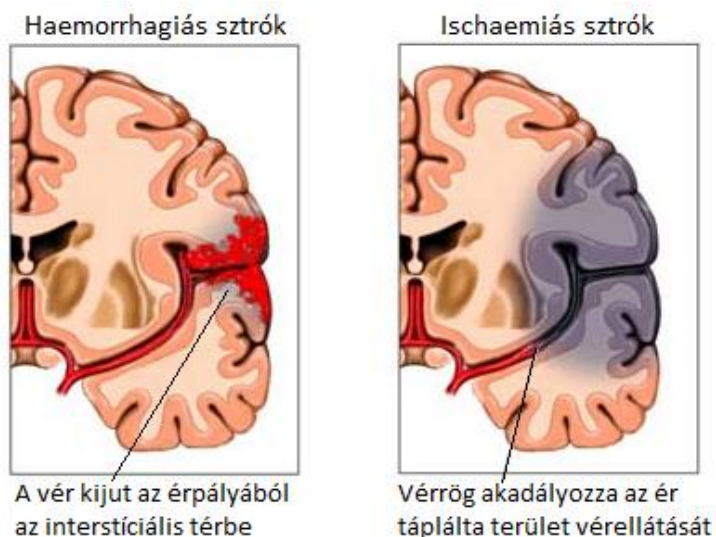
A világ vezető halálokait összesítő lista élén a koszorúér-betegségek állnak (évente 7,2 millió haláleset), a lista második helyét az agyi érbetegségek foglalják el (évente 5,7 millió haláleset), ezzel az egész világon bekövetkező halálesetek 9,7 %-át adják (Dal-Re, 2011).

Az agyérkatasztrófa, az agyvérzés a harmadik leggyakoribb halálokok Magyarországon is. Az érintett betegek közel egyharmada egy hónapon belül meghal, egy másik harmadánál pedig az agyi infarktus maradványtünetekkel gyógyul, tartós károsodást okoz. A kórkép hátterében számos kockázati tényező állhat, melyek önmagukban is, illetve egymással társulva a sztrók kialakulásához vezethetnek (Johnston és mtsai., 2009).

Az agyon a vér nyugalmi perctérfogatának mintegy 15 %-a áramlik át. Ez fiatal felnőttben, nyugalomban 54 ml/100 g/perc, ez a teljes agytömegre számítva mintegy 756 ml/perc. Az agyi idegszövet percenkénti oxigénfogyasztása átlagosan 3,5 ml/100 g, ami 49 ml/perc az egész agyat tekintve (Went, 1962). A fiziológiás működéshez szükséges véráram lecsökkenése az idegszövetben oxigén- és szubsztráthiányt okoz, ezt az állapotot agyi ischaemiának nevezzük.

A vérellátás zavarának helyétől, mértékétől és időtartamától függően helyi, vagy generalizálódó funkciókiesés alakulhat ki az agyban (Sauerbeck, 2006). Ha a véráramlás az

érintett területen rövid időn belül helyreáll, akkor tranziens ischaemiás eseményről (TIA, transient ischemic attack) beszélünk. Az agyérkatasztrófák azonban hosszabb idejű keringéskieséssel vagy véráramlás csökkenéssel járnak mint a TIA. Ezeknek 80-85 %-a



1. ábra: Az agyérkatasztrófák típusai, a haemorrhagiás és az ischaemiás sztrók sémája (<http://www.webmd.com/stroke/ischemic-versus-hemorrhagic-stroke> nyomán módosítva)

ischaemiás sztrók, amelyet az érpálya valamely ágának elzáródása okoz (Sudlow és mtsai., 1997). Az érszűkület, vagy vérrög által a keringéstől elzárt területen agyi ischaemia alakul ki. Az agyérkatasztrófák fennmaradó 15-20 %-a haemorrhagiás sztrók, vagy másnéven koponyaüri vérzés, ahol az érpálya sérüléséből adódóan a szöveti térbe vér kerül, a sérülés mögötti érszakaszon pedig jelentősen

csökken a véráramlás (Kidwell és mtsai., 2003). Az oxigén és glükóz ellátás kiesése mellett az intersticiális térbe kiáramló vér mechanikai terhelést is jelenthet az érintett terület idegszövetére nézve (Sauerbeck, 2006).

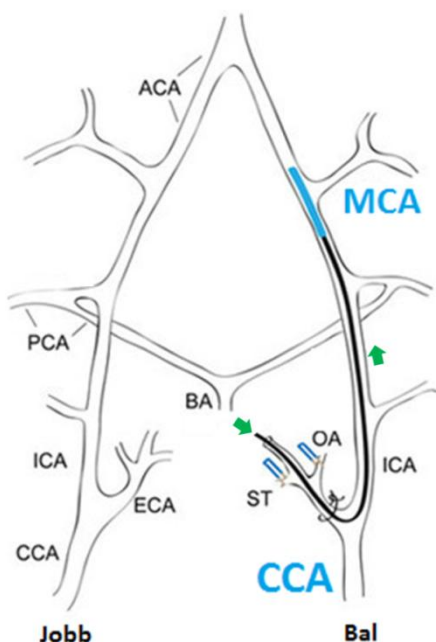
Agyi ischaemiát okozhat különböző patológiás állapotokból adódó szívmegállás is, ilyenkor globális agyi ischaemia áll elő. Az emberi agy összes területén egy időben bekövetkező ischaemiás állapot extrém módon megterheli a központi idegrendszert, ezt az a humán kísérlet is bizonyítja, amelyben 5-7 másodpercnyi globális agyi ischaemiát követően a kísérleti alany eszméletét veszítette (Rossen és mtsai., 1943).

A hosszan tartó csökkent agyi vérellátás nem csak cerebrovascularis károsodás által okoz neurológiai deficitet, hanem a megzavart kalciumhomeosztázis révén kulcsszerepet játszik számos kóros folyamat, mint például az epilepszia, a Huntington-kór, az amyotrophias lateral sclerosis, az Alzheimer-kór során észlelt patológiás, neurodegeneratív elváltozások kialakításában is (Celsis és mtsai., 1987; Yoshida és mtsai., 1988; Leigh és mtsai., 1996; Karhunen és mtsai., 2005).

1.2 A kutatásban alkalmazott ischaemiás állatmodellek

Az agyi vérellátás zavara ischaemiás vagy haemorrhagiás sztrók esetében egy adott központi idegrendszeri területet érint, míg a szívmegállásból adódó globális ischaemia bekövetkeztekor a teljes szervezet, és vele együtt az idegrendszer valamennyi területe oxigén- és szubsztráthiányban szenved. A keringési elégtelenség típusa, időtartama és kimenetelének súlyossága esetenként változik (Hossmann, 2008). A nem teljes agyat érintő, és a globálisan kialakuló hipoxia és hipoglikémia különböző mértékű károsodást okoz a neuronális hálózat működésében, valamint annak plaszticitásában (Marosi és mtsai., 2009; Gellert és mtsai., 2011).

Az agyérkatasztrófákkal, hipoperfúziós patológiás állapotokkal foglalkozó kutatásokban többféle ischaemiás állatmodellt is kialakítottak annak érdekében, hogy a különböző kóros állapotokat minél jobb közelítéssel tudják reprodukálni az állatkísérletek során (Perel és mtsai., 2007).



2. ábra: Patkány vaszkuláris anatómiája, a fő nyak- és fejtartériák rendszere. (Uluc és mtsai., 2011 nyomán módosítva) ACA: a. cerebalis anterior, BA: a. basilaris, ECA: a. carotis externa, ICA: a. carotis interna, OA: a. occipitalis, PCA: a. cerebalis posterior, ST: a. thyroidea superior

Patkány fokális ischaemiás modellként a hetvenes évek óta alkalmazzák a középső nagyagyi artéria elszorítását (MCAO, middle cerebral artery occlusion). A verőeret annak proximális szakaszán zárják el intraluminálisan, az úgynevezett filament technikával. Ilyenkor az arteria carotis communis-on (CCA, common carotid artery) keresztül bevezetnek egy rugalmas, szilikon bevonatú szálát, amelynek átmérője összemérhető az MCA-val, és ennek segítségével a vér áramlása leállítható, így megszüntethető az ehhez az artériához tartozó kérgi területek vérellátása (Uluc és mtsai., 2011). A modell segítségével a neocortex mellett a striatum területén is kialakítható lézió. A filament módszer előnye, hogy alkalmazásával kiváltható akár

többszöri tranziens, vagy permanens ischaemiás inzultus is (Brint és mtsai., 1988; Duverger és mtsai., 1988; Barone és mtsai., 1992b; Buchan és mtsai., 1992; Xue és mtsai., 1992; Barone és mtsai., 1997). Fokális ischaemia kiváltására szintén széles körben alkalmazzák a fototrombotikus léziót, amelyet 1985-ben először Watson kutatócsoportja írt

le (Watson és mtsai., 1985). A módszer lényege, hogy a trombózis kialakításához egy fényérzékeny festéket, legtöbbször Bengal Rose-t juttatnak a vérkeringésébe, majd a megfelelő helyen erős fénnel megvilágítják az intakt szövetet, jellemzően az agykérget. A megvilágítás a keringésben lévő anyag lokális aktiválódásához és szabadgyökök képződéséhez vezet, ami az endothélium peroxidációját okozza (Dietrich és mtsai., 1987). A folyamat végül a trombociták aktiválódása révén aggregátumok (trombusok) kialakulásához és a vér-agy gát sérüléséhez vezet (Rosenblum és mtsai., 1977; Lee és mtsai., 2007), ezáltal fokális agyi ischaemia alakul ki az érintett területen.

A teljes agyat érintő, de nem teljes ischaemiát, vagyis globális hipoperfúziót a kétoldali arteria carotis communis reverzibilis vagy irreverzibilis elzárásával (2VO, 2-vessel-occlusion) alakítják ki. A 2VO beavatkozást akut vagy krónikus agyi hipoperfúzió (atherosclerosis, arterio-venosus malformatio) és egyéb csökkent vérellátás során kialakuló betegségek pl. Alzheimer-kór (De Jong és mtsai., 1999; Farkas és mtsai., 2001) modellezésére is használják. A CCA-k leztorítása után az agy vérellátása azonnal az egyharmadára csökken (Farkas és mtsai., 2007), azonban a patkányok Willis-köre teljes (Farkas és mtsai., 2007), ezért a vérellátás redisztribúciójára és a csökkent vérellátás kompenzációjára lehetőség van. Ennek köszönhetően az érzékeny elektrofiziológiai mérések alapján elmondható, hogy a 2VO csak kis mértékben okoz zavarokat a szinaptikus plaszticitás folyamataiban (Li és mtsai., 2006; Marosi és mtsai., 2009). Az idegsejtek károsodásának és pusztulásának megjelenítésére irányuló morfológiai vizsgálatokkal pedig még nem sikerült jelentős különbséget kimutatni az intakt állapothoz képest (Marosi és mtsai., 2009). A módszer előnye, hogy egyaránt alkalmas többszöri tranziens, és permanens ischaemia kialakítására is.

A teljes, globális agyi ischaemia kialakítására alkalmas az úgynevezett 4 ér-elzárás módszere (4VO, 4-vessel-occlusion), amelyben az agy vérellátása meghatározott időre teljesen megszűnik (Pulsinelli és mtsai., 1979). Ez a műtéti beavatkozás a szív-megállást modellezi. Ezt az állapotot a kétoldali arteria vertebralis elektrokauterrel történő irreverzibilis elroncsolásával és a CCA-k meghatározott időre történő reverzibilis leztorításával idézik elő (Burda és mtsai., 2006; Sas és mtsai., 2008). Mivel a kéreg mellett a hippocampus CA1-es régiója a legérzékenyebb agyterület az oxigén és tápanyag hiányos állapotokra (Pulsinelli és mtsai., 1983), ezen az agyi területen már néhány perces 4VO-t követően is kiterjedt, 60-70%-os sejtpusztulás mutatható ki (Burda és mtsai., 2006; Sas és mtsai., 2008).

1.3 A Wistar és a Sprague-Dawley patkánytörzsek és kísérleti alkalmazhatóságuk

A tudományos kísérletek céljából elsőként felhasznált emlős állat a vándorpatkány (*rattus norvegicus*) volt. A közel 220 beltenyésztett törzs közül napjainkban a tudományos kutatásban a Wistar és a Sprague-Dawley patkányok váltak a leggyakrabban alkalmazott kísérleti állatokká (Hedrich, 2000). A ma már Wistar Charles River néven ismert patkánytörzs eredetileg a Wistar Intézetből származott, amelyet 1947-ben vett át a Scientific Products Farm, Ltd., amely a mai Charles River Laboratories elődje volt, és ahová 1975-ben vezették be ennek a törzsnek a tenyésztését (Hedrich, 2000).

A Sprague-Dawley, amelyet bizonyos vándorpatkány törzsek keresztezéséből elsőként tenyésztett ki a Sprague-Dawley Company 1925-ben, a későbbiekben, 1979-ben az ARS/Sprague-Dawley-től került át a SASCO vállalathoz. A törzset a Charles River Laboratories 1996 óta tenyészt, és elérhetővé teszi a tudományos kutatás számára (Hedrich, 2000).

Több, egymástól független kutatócsoport is leírta már az emberben kialakuló ischaemiás állapotokból és a kísérleti állatokban előidézett hasonló ischaemiás beavatkozásokból származó adatok jelentős eltérését. Nyilvánvaló az, hogy a cerebrovaszkuláris betegségek állatkísérletes modellezésekor nemcsak az adott kórképnek megfelelő agyi területet érintő, és a megfelelő időbeli elrendezéssel alkalmazott ischaemiás műtéti módszer kiválasztása, hanem a legmegfelelőbb patkánytörzs megválasztása is elengedhetetlenül fontos. Az irodalomból ismert az, hogy vaszkuláris anatómiai különbségek nemcsak a különböző fajok között, hanem az eltérő törzsek között, és az állattörzsekben belül is felfedezhetők (Oloff és mtsai., 1995a; Oloff és mtsai., 1995b; Oloff és mtsai., 1996). A patkány Willis-körének anatómiai szerkezetében Brown már 1966-ban leírt hat egymástól eltérő változatot (Brown, 1966). A napjainkban alkalmazott kísérleti állattörzsek speciális tulajdonságai épp az ilyen jellegű eltérésekből származhatnak (Ginsberg és mtsai., 1989; Barone és mtsai., 1992a). Azonos kísérleti elrendezésből adódhatnak más eredmények abban az esetben is, ha az egymással azonos patkánytörzsek beszerzése különböző állattenyésztő cégeken keresztül történt (Marosi és mtsai., 2006). Sok tényező befolyásolja tehát, hogy a fokális és globális ischaemia modellek kísérletes alkalmazásával kiváltható központi idegrendszeri sejtpusztulás és funkciókárosodás milyen mértékben következik be (Barone és mtsai., 1993).

A Wistar és a Sprague-Dawley (SD) patkánytörzsek élettani folyamatai számos tekintetben eltérnek egymástól. A két törzs egymástól való különbségeit többek között

leírták már a magatartásvizsgálatokban tapasztalható eltérő stresszválaszaik alapján is. A Wistar patkányokban nagyobb fokú stresszt váltott ki a fénnel történő tartós megvilágítás modellje, az elkülönítés, amelyet a későbbi aktív társas interakciók időtartamán, azok gyakoriságán és a többi állattal történő első érintkezésig eltelt idő megmérésén keresztül követtek figyelemmel. Emellett a Wistar patkányokban az első társas érintkezés latenciája jelentősen nagyobb mértékben nőtt meg egy erős nyugtatószerrel, a diazepammal végzett kezelés hatására (Rex és mtsai., 2004). Az SD állatok viselkedése nem különbözött a körülmények változtatása előtt és után, valamint a diazepam is csak jóval nagyobb dózisban volt hatásos. A Wistar patkányok agyában ezen kívül jelentősen magasabb volt a szerotonin koncentrációja stresszes állapotban. A két patkánytörzsnek továbbá alapvetően eltért a társas viselkedési mintázata is (Nunn és mtsai., 1994; Rex és mtsai., 2004; Walker és mtsai., 2009; Valdez és mtsai., 2012). A rövid- és hosszútávú memória kísérletesen megnövelt vérnyomás hatására való leromlását is megfigyelték a Wistar és az SD állatokban. Fiziológiai sóoldat i.v. injekciója után az SD állatok jobb eredményeket értek el az emlékek rövid- és hosszútávú rögzülését tesztelő kísérletekben, mint a Wistar patkányok. A d-amfetamin kezelés hatására az SD állatokban kevésbé károsodtak a rövid távú memória folyamatai, mint a Wistar patkányokban. A Ricart és csoportja által végzett kísérletekben azonban a Wistar patkányok a klasszikus kondicionálás terén és a megerősítéssel kondicionált magatartáspróbák során jobb hatásfokkal és rövidebb tanulási idő alatt végezték el a feladatokat, mint az SD állatok (Meneses és mtsai., 2011; Ricart és mtsai., 2011).

Különbségeket mutattak ki a Wistar és az SD patkányokban az általános érzéstelenítés hatására történő biokémiai változásokban is. Az 5 órán át tartó izoflurán altatás ideje alatt a Wistar patkányokban a vér pH-ja lecsökkent 7.1-re, a laktát szintje 53 %-al megemelkedett, a kreatinin szintje 2.7-szeresére nőtt meg, az alanin aminosztransferáz és az aszpartát aminosztransferáz enzimek az altatás előtti szintjük 4-szeresét érték el, míg a laktát-dehidrogenáz enzim szintje 9-szeresére nőtt meg. Ezzel szemben az SD állatokban nem történt semmilyen változás a vizsgált biokémiai és enzimaktivitási paraméterekre nézve, azonban az altatás ideje alatt az SD patkányok artériás középnyomása 34 %-al magasabb volt (Siller-Matula és mtsai., 2008).

Jelentős különbségek fedezhetők fel a Wistar és az SD állatok enzimatisz aktivitásában is. A korábbi kísérleteknél már említett diazepam lebontásában markáns különbségeket mutatott a két patkánytörzs. Az SD állatok májában a diazepamot elbontó mikroszómális p-hidroxilációs enzimaktivitás szintje 300-szorosa volt a Wistar

patkányokban mérhető p-hidroxiláz aktiviásnak. Imamura és csoportja azt vizsgálta meg, hogy a Wistar és az SD állatoknak i.v. beadott acetohexamid milyen mértékben alakul át alkohol metabolitjává a szintén máj mikroszómában működő karbonil reduktáz enzim aktivitásának köszönhetően. Eredményeik arra mutattak rá, hogy a jelentősen alacsonyabb mikroszómális karbonil reduktáz aktivitásból adódóan a Wistar patkányok vérplazmájában sokkal lassabban csökkent le az ugyanakkora mennyiségben beadott acetohexamid koncentrációja, mint azonos időperiódus alatt az SD állatok vérplazmájában (Saito és mtsai., 2004; Imamura és mtsai., 2005).

Végeztek továbbá vizsgálatokat a Wistar és az SD patkányok génexpressziós különbségeinek feltárására is. A 2-acetylaminofluorén lebontásához szükséges az *mdr1b* gén terméke. Az *mdr1b* gén, a multidrog rezisztenciáért felelős gének egyike, sokkal kisebb kifejeződést mutatott az SD patkányokban 2-acetylaminofluorén beadását követően, mint a Wistar patkányokban. A Wistar és az SD patkányok májából vett sejtek kultúráiban *in vitro* magasabb volt a gén alapvető kifejeződése is, mint az SD állatok májsejttenyészeiben (Hill és mtsai., 1996).

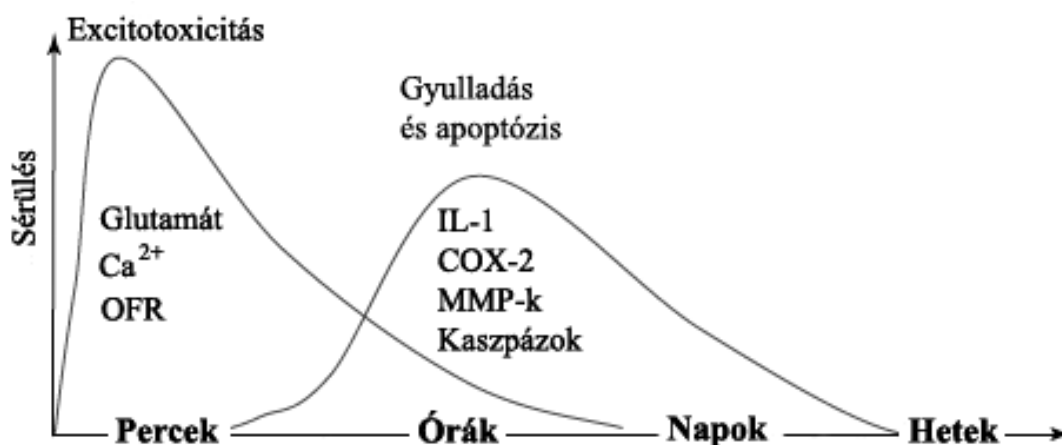
Fototrombotikus lézió modellben, ahol az MCA falán keresztül lézer fénnyel aktiválták az i.v. beadott Bengal Rose fényérzékeny festéket, és közben a CCA-kat leztorították, a Wistar patkányok nagyagykérgén kisebb kiterjedésű ($48.4 \pm 26.9 \text{ mm}^3$) léziót határoztak meg, mint az SD állatok ($130.5 \pm 40.0 \text{ mm}^3$) esetében. A mérhető lézió esetenkénti változékonysága a Wistar állatokban azonban jóval nagyobb (55,6 %) volt, mint az SD patkányokban (30,7 %). Ezzel szemben a 90 percig tartó tranziens MCAO után a reperfúzió sokkal nagyobb léziót eredményezett a Wistar patkányok neocortexében, mint az SD állatok ugyanezen területén. Ugyanakkor a permanens MCAO-t követő vizsgálatok azt mutatták, hogy az SD patkányok jelentősen nagyobb szöveti károsodást szenvedtek, mint a Wistar patkányok (Markgraf és mtsai., 1993; Walberer és mtsai., 2006).

Mind a Wistar, mind az SD (Phillis és mtsai., 1994; Vered és mtsai., 1994; Caragine és mtsai., 1998; He és mtsai., 2004; Zhou és mtsai., 2004) széles körben alkalmazott patkánytörzsek a különböző agyi ischaemiás kutatásokban, mindkettőt gyakran használják globális ischaemiás modellek kialakításához, mint amilyen a 4VO modell.

Mindezidáig azonban nem írták le a Wistar és az SD patkánytörzsben a globális ischaemia hatását és legfőképpen a 4VO kimenetelében tapasztalható különbségeket a két törzs között.

1.4 Az ischaemiát követő folyamatok időbelisége

Az ischaemiás inzultus hatására beinduló folyamatok pontos időbeli behatárolása kiemelten fontos a hatásos neuroprotektív terápiák megtervezésekor. Rögtön az agyi ischaemiát követően az extracelluláris térből bejutó, és intracelluláris raktárakból felszabaduló Ca^{2+} rohamosan megnöveli az ion-koncentrációt a sejtekben (Suzuki és mtsai., 1998). Az oxigén szabadgyökök keletkezése az ischaemiás periódus után nagyon rövid időn, percekben belül szintén megtörténik (Olmez és mtsai., 2012). A glutamát (Glu) koncentrációja az ischaemia következményeként fellépő depolarizációból adódóan ugyancsak megnő, és a sejtek túlserkentésével percekben mérhető idő alatt excitotoxikus állapotot hoz létre (Castillo és mtsai., 1996).

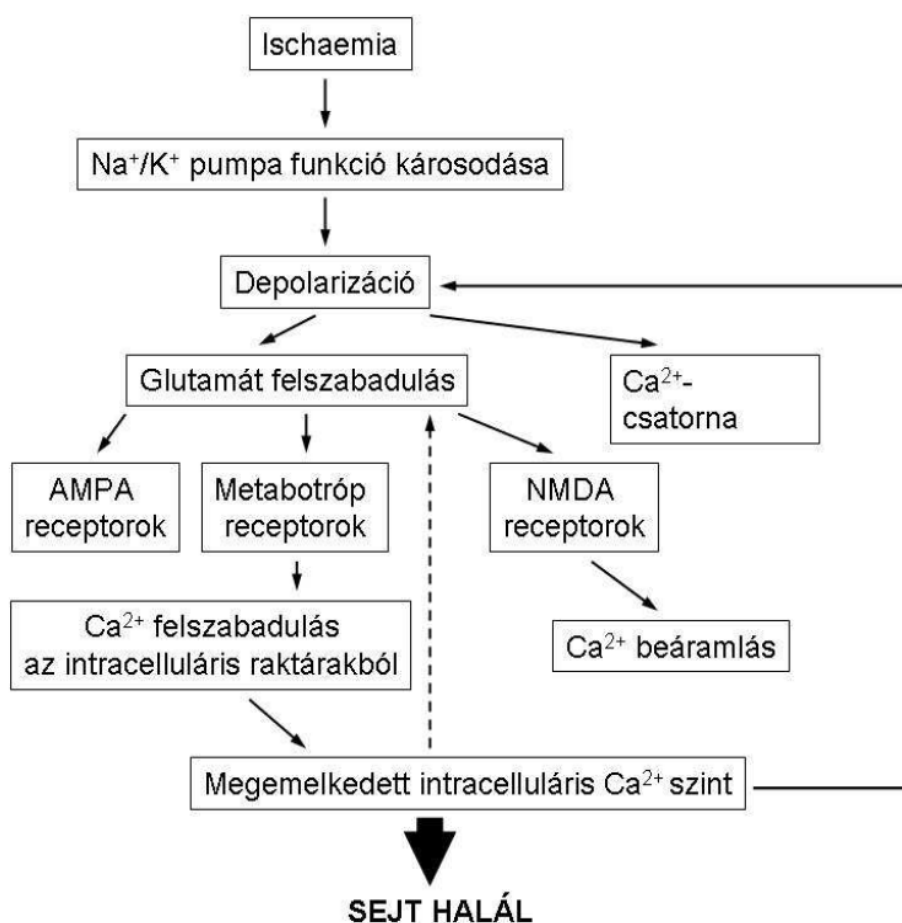


3. ábra: Agyi ischaemiát követő patológiás folyamatok időbeli vázlata (Dirnagl és mtsai., 2003 alapján módosítva). OFR: oxigén szabadgyökök; IL-1: interleukin 1; COX: ciklooxygenáz; MMP: mátrix metalloproteáz

A sejtek károsodott funkciói és a magas intracelluláris Ca^{2+} koncentráció miatt bekapcsol az apoptotikus kaszkád folyamata és ezzel egy időben a gyulladásos folyamatok megindulása szintén megtörténik. Lefolyásuk az ischaemia mértékétől függően napokig, hetekig tarthat (3. ábra). A gyulladásos folyamatok során az ischaemia érintette agyi régióban jellemzően megemelkedik az interleukin-1 koncentrációja, valamint az idegszövetben fokozott ciklooxygenáz és mátrix metalloproteáz aktivitás mutatható ki (Dirnagl és mtsai., 2003). Az ischaemiás inzultus típusától és az érintett terület nagyságától függően a rövid távú, excitotoxikus folyamatok kivédése is lehet önmagában alkalmazva teljes mértékben neuroprotektív, főként akkor, ha az inzultus nem okoz morfológiai, csak plaszticitásbeli változásokat (Marosi és mtsai., 2009). A nagyobb mértékű károsodással, sejtpusztulással járó ischaemiás behatást követően azonban érdemes lehet mind a rövid távú, mind a hosszú távú poszt-ischaemikus folyamatokat visszaszorítani egy esetleges kombinált, azaz több támadáspontú kezelés alkalmazásával.

1.5 A glutamát és a programozott sejthalál

A központi idegrendszer hipoperfúziós sérülései következtében a károsodott terület a nekrotikus központi magra (core) és az azt köpenyszerűen körülvevő penumbrára különíthető (Hermann és mtsai., 1999; Plesnila és mtsai., 2003; Hermann és mtsai., 2004). A core régióba eső sejtek nekrotizálódnak, ez a folyamat a sejtek irreverzibilis károsodását, gyors és kiterjedt pusztulását jelenti, amelyet reaktív leukocita-infiltráció vesz körül, és hegesedés követ. A penumbra régió lecsökkent vérellátását a helyi kollaterális-áramlás részben biztosítja, így ennek állapota nagyban meghatározza a későbbi károsodás



4. ábra: Ischaemia hatása az intracelluláris Ca²⁺ koncentráció alakulására. (Lyden és Wahlgren, 2000 alapján módosítva)

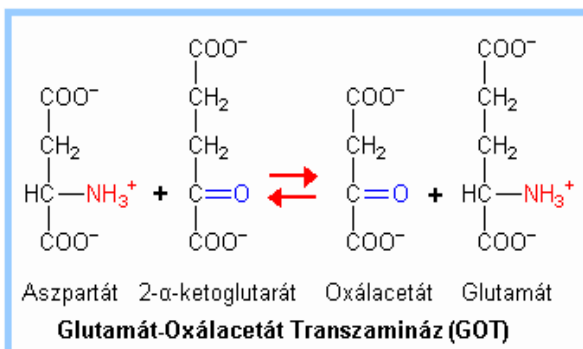
kiterjedését. Ischaemiás sztróknál az idegszövetben az elzáródás mögötti területen az ellátottság hiányában hypoxia és hypoglikémia egyszerre lép fel. Az agyi véráramlás csökkenése molekuláris események sorát, az úgynevezett ischaemiás kaszkádot indítja be (Tsuchiya és mtsai., 1992). Az apoptózis egy genetikailag szabályozott sejtpusztulás, amelyet a patológiás körülmények indíthatnak el a szükségesnél korábban. Az agyi

vérellátási zavarokban jelentkező apoptózist elsődlegesen az oxigén-, szubsztráthiány és a következményes ATP-szint csökkenés indítja el, amely közvetve a Ca^{2+} intracelluláris koncentrációjának emelkedéséhez vezet (Suzuki és mtsai., 1998). A Ca^{2+} -nak az extracelluláris térből az idegsejtekbe való bejutásában több mechanizmus játszik szerepet (4. ábra). Az ATP hiánya miatt az aktív Ca^{2+} pumpához kötött transzport diszfunkciója mellett, a Na^+/K^+ -ATP-áz csökkent működése sejtmembrán-depolarizációt okoz, ezáltal feszültség-függő Ca^{2+} csatornák nyílnak meg, és a Ca^{2+} szabad beáramlását teszik lehetővé. A depolarizáció következtében az N-metil-D-aszpartát (NMDA) típusú Glu kötőhellyel rendelkező ioncsatornák és az α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxalon-propionsav (AMPA) ionotróp csatornák nyílnak ki (Jatzke és mtsai., 2002). Két endogén Ca^{2+} raktár is megnyílik, az endoplazmatikus retikulum és az ischaemiás károsodásból adódóan a mitokondriumok (Cali és mtsai., 2012; Zhao és mtsai., 2012). Az intracelluláris Ca^{2+} -szint emelkedése további Glu felszabadulást okoz az axonterminálisokból, túlfokozva a szinaptikusan kapcsolt sejtek működését, excitotoxikus állapotot produkálva ezzel. Az öngerjesztő folyamat az apoptotikus kaszkád bekapcsolását eredményezi. A megemelkedett ionkoncentráció az idegsejtekben több Ca^{2+} -függő enzimet is aktivál. Ilyen többek között a foszfolipáz-A2 (PLA2), amely a lipidmembrán közvetlen lízisét eredményezi, valamint a nitrogén-oxid-szintetáz (NOS), ami nitrogén-oxid és peroxi-nitrit képzése útján okoz lipid-peroxidációt (Zádor és mtsai., 2003). A Glu tehát nem csak az apoptotikus folyamatok beindításában, de azok szöveti terjedésében is prominens szerepet kapott; közreműködik például a távolabbi neuronok károsodásában (Zhang és mtsai., 1998), az agyi ischaemiában (Garcia-Galloway és mtsai., 2003), a Huntington-kórban (Storey és mtsai., 1992) és az epilepsziás rohamok kialakulásában is (Dingledine és mtsai., 1990).

Az ischaemiás állapot következtében megjelenő nagy mennyiségű Glu tehát fokozza az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációt és egy öngerjesztő folyamat beindításán keresztül tovább növeli a Glu felszabadulást, további Ca^{2+} -ot felszabadítva az intracelluláris raktárakból. A Glu az apoptotikus folyamatok aktiválásán túl a penumbra növekedéséért is felelős. Mindezek alapján indokolt lehet egy új neuroprotektív stratégia, melynek támadáspontja a magas extracelluláris Glu koncentráció csökkentése az agyszövetben.

1.6 A glutamát scavenging élettani alapjai

Az extrém módon magas Glu-szint az emlős agyban jellegzetes körülménye az olyan neurodegeneratív behatásoknak, mint az agyvérzés, vagy a traumás agyi sérülések (Castillo és mtsai., 1996; Zauner és mtsai., 1996; Johnston és mtsai., 2001). A Glu koncentrációját az agy extracelluláris terében serkentő aminosav transzporterek (EAAT, excitatory amino acid transporter) tartják a fiziológias tartományban, az excitotoxikus küszöbérték alatt,



5. ábra: A GOT enzim által mediált transzamináció kétirányú, egyensúlyi folyamata. (FJ saját ábrája)

melyek neuronokon, gliasejteken és az agyi kapillárisok endothel sejtjein egyaránt megtalálhatók (O'Kane és mtsai., 1999; Danbolt, 2001; Gottlieb és mtsai., 2003). Ezek a transzporterek a vérbe transzportálják a Glu-t, így fontos szerepet játszanak az agy extracelluláris Glu-szintjének csökkentésében, annak gyors

vérplazmába juttatásával (Berl és mtsai., 1969). A transzport percekben belül mérhető Glu koncentrációbeli különbségeket eredményez az interstitiális folyadék (ISF, interstitial fluid) és a vérplazma között (Gottlieb és mtsai., 2003). Az ISF-ben az uralkodó Glu koncentráció 1-10 μM , míg a vérplazmában 40-60 μM . A meglévő koncentráció gradiens ellenére mégis létrejön egy az agyból a vér felé irányuló Glu transzport a kapillárisok abluminális oldalán található Na^+ -függő EAAT-k segítségével (O'Kane és mtsai., 1999). A neuroprotekción kutatásában az EAAT-k ezidáig elkerülték a tudományos érdeklődést. A Glu koncentrációgradiense az ISF és a vérplazma között megnövelhető, így maga a transzport is felgyorsul. A vér Glu szintje oxálecetsavval és piruváttal is csökkenthető, ezek az anyagok ugyanis koszubsztrátjai a vérplazma kiemelt fontosságú enzimeinek, a Glu-oxálecetsav transzamináznak (GOT) és a Glu-piruvát transzamináznak (5. ábra). Ezek az enzimek az oxálecetsav és a piruvát jelenlétében képesek hatékonyan átalakítani a Glu-t aszpartáttá és 2- α -ketoglutaráttá a koszubsztrátok elégséges koncentrációja mellett, ezzel csökkentik a vér Glu koncentrációját. Az asztrocitákon lévő EAAT-k ischaemiás körülmények között „fordított” működésbe kezdenek míg az endothel sejteken található EAAT-k zavartalanul működnek stabil membránpotenciáljuknak köszönhetően (Nicholls és mtsai., 1990). A Glu "szívóhatás" fokozásával az ISF excitotoxicitáshoz vezető kórosan magas Glu koncentrációja így lecsökkenthető valamint a túlserkentésből adódó funkcióvesztés és a sejtpusztulás pedig mérsékelhető (Gottlieb és mtsai., 2003).

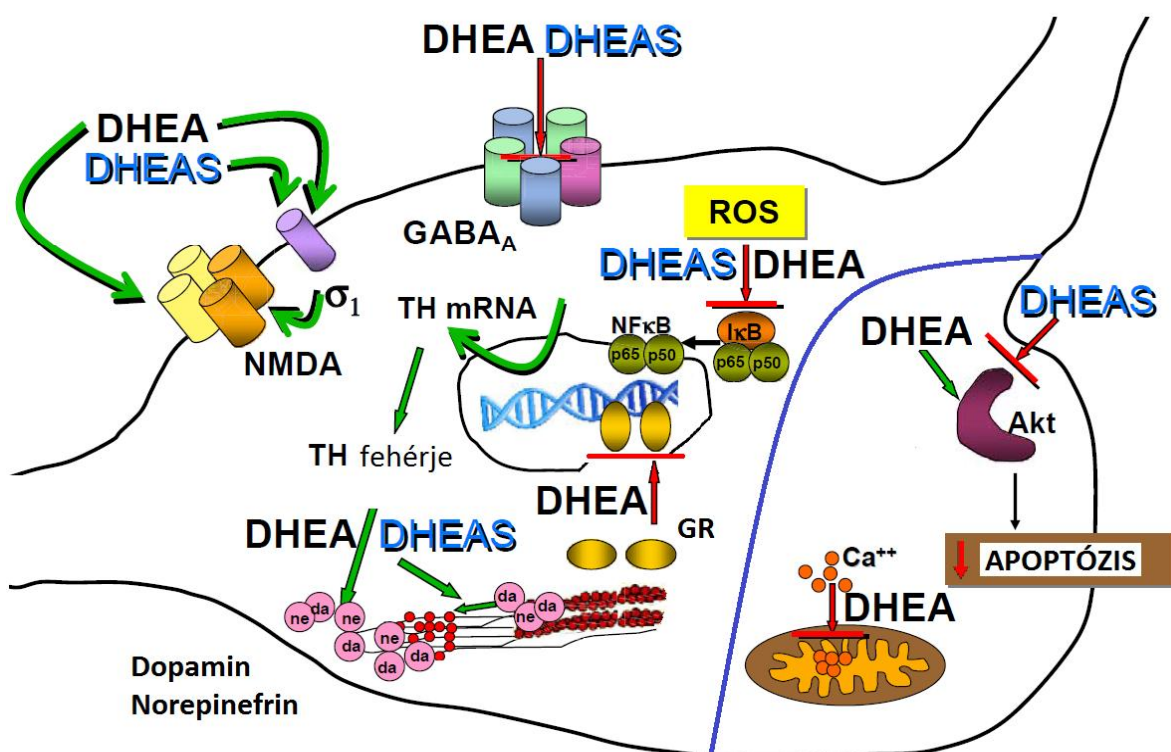
1.7 A DHEA mint endogén neuroprotektív neuroszteroid

A dehidroepiandroszteron (DHEA) és szulfát-észtere, a dehidroepiandroszteron-szulfát (DHEAS) a legnagyobb mennyiségben előforduló neuroszteroidok az emberi szervezetben. Ennek ellenére élettani szerepük, és a hatásmechanizmusukhoz köthető kóros állapotok kialakulása még nem minden részletében ismert (Maninger és mtsai., 2009). Az életkor előrehaladtával koncentrációjuk lecsökken a szervezetben, és a csökkenés plató fázisához rendelhető életkorban jellemzően megnő az öregedés folyamataihoz kapcsolható betegségek kialakulásának valószínűsége (Maninger és mtsai., 2009). A DHEA és DHEAS felfedezése és első megszintetizálása után nem sokkal, már 1952-ben írtak a neuropszichiátriai betegségek neuroszteroidokkal végzett kezelésének sikerességéről (Sands és mtsai., 1952; Strauss és mtsai., 1952). Az ehhez hasonló megfigyelések és az egészen a kilencvenes évek közepéig felhalmozódó, alapkutatásból, valamint a preklinikai kísérletekből származó eredmények azt igazolták, hogy a DHEA kezelés, az öregedéssel összefüggésbe hozható betegségek gyógyításában ígéretes terápiás lehetőséget hordoz magában (Morales és mtsai., 1994).

A DHEA és DHEAS számos élettani mechanizmusban részt vehetnek, mint neuroszteroidok. Egyik legfőbb biológiai hatásuk a neuroprotekciónak, amelyet gyulladáscsökkentő aktivitásukon keresztül is megvalósítanak. A DHEA lecsökkenti az interleukin 6 (IL-6) és a tumor nekrosis faktor α (TNF α) termelését *in vitro*, ezzel egyúttal gátolja a TNF α által kiváltott NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) aktivációt (Iwasaki és mtsai., 2004). Az NF- κ B egy transzkripciós faktor, amely a gyulladás, az autoimmun válasz, a sejtostódás és az apoptózis folyamataiban központi szerepet játszik az ezeket a mechanizmusokat irányító gének szabályzásával. Felépítésüket tekintve ezek a transzkripciós faktorok a háromféle RelA fehérje, a p50, p52 és p65, valamint a RelB és RelC fehérjék homo- és heterodimerei (Hanausek-Walaszek és mtsai., 1990). Leggyakoribb formája a p50 és a p65 alegységekből álló heterodimer, amely a génindukció leggyakoribb résztvevője. A DHEAS szintén bizonyította *in vitro* kísérletekben, hogy a TNF α kiváltotta NF- κ B aktivációt, a H₂O₂ által kiváltott NF- κ B aktivációt is képes gátolni, emellett bizonyított az is, hogy ezt a gátló hatást közvetett módon, citokinek aktivációján keresztül valósítja meg, amely szorosan összefügg a reaktív oxigén vegyületek (ROS, reactive oxygen species) képződésével (Iwasaki és mtsai., 2004). A DHEA ezen kívül szintén gyulladáscsökkentő hatást fejt ki a kortikoszteroidok neurotoxikus hatásának kivédésével *in vivo* (Karishma és mtsai., 2002) és *in vitro*

(Kimonides és mtsai., 1999), bár ezeknek a folyamatoknak a pontos hatásmechanizmusa még nem teljesen ismert.

A DHEA és a DHEAS hasonlóan fejtik ki hatásukat a GABA_A receptorok gátló modulálásában. Nem-kompetitív GABA_A antagonistaként a DHEAS képes fokozni az ischaemiás toleranciát *in vivo* (Majewska, 1992; Lapchak és mtsai., 2000). Az is elképzelhető azonban, hogy a DHEA és a DHEAS *in vivo* alkalmazásuk közben az élő szervezetben átalakulnak valamilyen GABA_A agonista vegyületekké, például androszteronná, és neuroprotektív hatásuk a receptorok serkentésén keresztül valósul meg (Kaminski és mtsai., 2005).



6. ábra: Az idegsejtek DHEA és a DHEAS által befolyásolt folyamatai. (Maninger és mtsai., 2009 nyomán módosítva)

Ismert tény az is, hogy a DHEA és DHEAS befolyásolja a katekolamin szekréciót, a hormonok transzkripciós szabályzásának kikerülésével is, ugyanis fokozzák a szekréciós katekolamin vezikulákat rögzítő aktin filamentumok depolimerizációját. Ennek eredményeképpen a szekréciós vezikulák képesek eljutni az excitotikus membránhoz, vagyis a neuroszteroidok fokozzák a szekréciós vezikulák által termelt katekolaminok mennyiségét (Charalampopoulos és mtsai., 2005).

A DHEA és DHEAS, az NMDA receptorok serkentésével a kísérlet időbeli elrendezéséből adódóan azonban akár fokozhatják is az ischaemia után kialakuló excitotoxicitást (Cardounel és mtsai., 1999; Kaasik és mtsai., 2001). *In vitro* kísérletekben azonban

neuroprotektívnak bizonyult a két neuroszteroid. A DHEAS az NMDA, míg a DHEA az AMPA és a kainát receptorokhoz köthető excitotoxicitás kivédésében is hatásosnak bizonyult (Cardounel és mtsai., 1999; Kaasik és mtsai., 2001). A neuroszteroidokkal való kezelés ischaemiás periódushoz viszonyított időbeli elrendezése dönti el azt, hogy az excitotoxikus állapotot fokozzák, vagy épp ellenkezőleg, kivédik. A DHEA kezelés globális ischaemia előtt és után egy órával jelentősen növelte a sejtpusztulást mértékét, míg az ischaemiás inzultus után 12, 24, és 48 h-val már egyértelműen neuroprotektív volt SD patkány hippocampus CA1 régiójában (Li és mtsai., 2009).

A két ismert neuroszteroid közül csak a DHEA kezelésről ismert az, hogy kisagyi szemcsesejt kultúrákban a megnövekedett intracelluláris Ca^{2+} koncentráció kialakulásának esetében megakadályozza a Ca^{2+} ionok túlzott mértékű, mitokondriális mátrixba való beáramlását (Kaasik és mtsai., 2003). A mitokondriumok a fiziológiás és a kóros állapotokban is adnak, és fogadni is képesek Ca^{2+} szignálokat a citoszolban lévő Ca^{2+} felvételével és leadásával. A mitokondrium mátrixában extrém módon megnövekedő Ca^{2+} koncentráció egy tipikus kiindulópontja az agyi ischaemia után meginduló apoptotikus folyamatoknak (Gouriou és mtsai., 2011).

Az apoptózis folyamatainak befolyásolásában a DHEA és a DHEAS hatása teljes mértékben ellentétes. A DHEA *in vitro*, 50nM és 100nM koncentrációban neuronális prekursor sejtekben működésbe hozza az Akt kinázt, ami egy szerin-threonin protein kináz (Zhang és mtsai., 2002). Az Akt kináz gátolja az ischaemiás állapotot követő apoptotikus folyamatokat, és ezzel egyúttal hozzájárul az idegsejtek túléléséhez (Downward, 1998). Az ösztrogén receptor antagonistájával, tamoxifennel és az androgén receptorok blokkolójával, flutamiddal végzett kísérletekben sem változott meg az Akt kináz aktivitása, így bizonyítva hogy nem más vegyületté történő átalakuláson keresztül fejt ki a DHEA az Akt kináz aktiváló hatását. Érdekes módon a DHEA-val azonos mennyiségű DHEAS ugyanilyen körülmények között ellentétes hatást váltott ki, vagyis csökkentette az Akt kináz aktivitását, és ez által fokozta az apoptózis mértékét (Zhang és mtsai., 2002).

Így tehát a DHEA és DHEAS eltérő módon hatnak az apoptotikus folyamatokra, ami arra enged következtetni, hogy a két neuroszteroid megfelelő egyensúlya nélkülözhetetlen az idegrendszer zavartalan fejlődéséhez és működéséhez, emellett védőhatásaikból, és endogén természetükből kifolyólag alkalmasak lehetnek különböző neuroprotektív stratégiák kialakítására.

1.8 A szinaptikus plaszticitás és az LTP

A kognitív agyi folyamatok működése szoros összefüggésben van a szinaptikus jeltovábbítás változásával, a szinaptikus plaszticitással (Bliss és mtsai., 1973). Az egyedfejlődés során a szinapszisokban történő változások teszik lehetővé a külső és belső környezet változásaihoz való adaptív alkalmazkodást. A tanulás folyamatában a szinaptikus jeltovábbítás hatékonysága a tanulás fázisaitól függően is váltakozik. Az új információk kialakításában, az új emléknym létrejöttében és az új ingerekhez való adaptációban kulcsfontosságú tényező a szinaptikus plaszticitás, amelynek tanulmányozása különböző neurológiai betegségek és idegrendszeri sérülések gyógyításához szintén segítséget nyújthat. A szinaptikus plaszticitás vizsgálata napjaink idegtudományi, idegéletani kutatásainak egyik központi területe. A szinaptikus plaszticitást többféle módon, például elektrofiziológiai módszerekkel is vizsgálhatjuk (Bliss és mtsai., 1973).

Páros impulzus plaszticitás

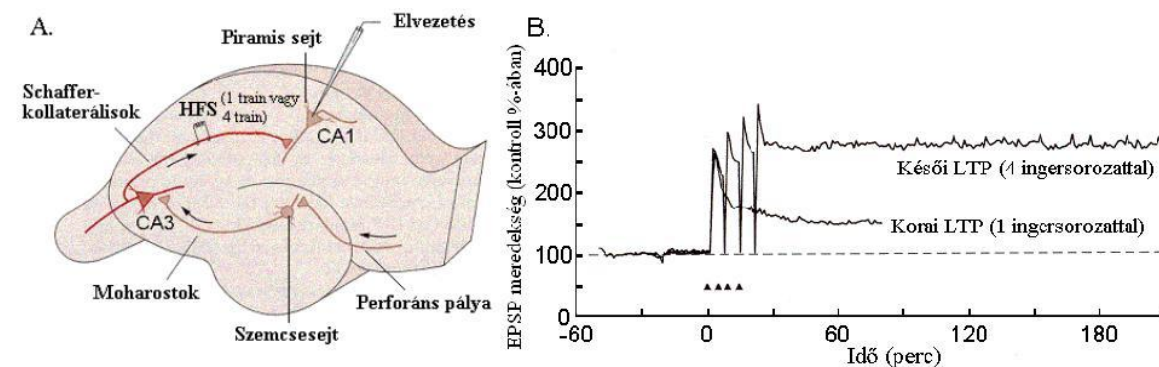
A plaszticitás legegyszerűbb formája a páros impulzus facilitáció (PPF, paired pulse facilitation), és ennek ellentétes hatását párja, a páros impulzus depresszió (PPD, paired pulse depression). A legtöbb hippocampusban lévő szinapszis esetében detektálható a PPF, ami a szinaptikus válasz amplitúdójának növekedésében nyilvánul meg. A páros impulzus első tagját rövid idővel követő második impulzus váltja ki az aktivitás növekedését. A két közeli impulzus együttes hatásaként nagyobb mértékben nő meg a kísérletek során leggyakrabban mért serkentő posztzinaptikus mezőpotenciál (fEPSP, field-excitatory postsynaptic potential) amplitúdója, mint abban az esetben, ha a két impulzus időben egymástól távolabb helyezkedik el. Eltérő impulzusok közötti időintervallumokkal mérve, 25, 50, 75 és 100 ms eltéréssel jelentős különbséget mutat az EPSP amplitúdó változása (Li és mtsai., 2005). A PPF hatásfokát, fEPSP növelő hatását a két ingerlés közötti idő hossza határozza meg, maximumát körülbelül 50 ms eltérésnél éri el, míg 500 ms és annál hosszabb időintervallum már exponenciális válaszcsökkenést okoz. A PPF egy preszinaptikus jelenség (Isaac és mtsai., 1998), és gyakran alkalmazzák preszinaptikus változások befolyásolására vagy megfigyelésére, többek között az LTP vizsgálata közben is (Li és mtsai., 2005).

Poszt-tetanikus potencírozódás

Rövid ideig, 2-5 s-ig tartó nagy frekvenciás, 10-200 Hz-ig terjedő ingerlést követően egy gyorsan elcsendesülő aktivitás-növekedés következik be, amelyet poszt-tetanikus potencírozódásnak (PTP, post tetanic potentiation) neveznek (Lloyd, 1949). A plaszticitás ezen formáját ismétlődő, nagyobb frekvenciájú ingerlés indukálja, amelynek kifejeződéséért valószínűleg a szabályos időközönként adott, sokszor ismétlődő ingerlés hatására a preszinaptikus axon terminálisban felgyülemelő Ca^{2+} felelős. Az aktivitás megnövekedett volta egy percnél nem tart tovább, a megnőtt EPSP visszacsökken az eredeti értékére. Kísérletes körülmények között ezt a jelenséget is preszinaptikus változásokhoz köti a szakirodalom (Bao és mtsai., 1997).

Az LTP

A szinaptikus plaszticitás sejtszinten legtöbbet tanulmányozott formája a hosszú távú potencírozódás (LTP, long term potentiation). Az LTP tulajdonképpen egy gyűjtőfogalom, ami több különböző folyamatot is magában foglal, melyek során a szinaptikus változások nagyban eltérnek a többi - szinaptikus működésnél megfigyelhető - rövid távú serkentéstől



6. ábra: A: A Schaffer-kollaterálisok stimulálásával a CA1 régió piramis sejtjeiben kiváltott válasz elvezetése B: Az 1 ingersorozattal kiváltott korai LTP és a 4 ingersorozattal kiváltott késői LTP összehasonlítása az EPSP meredekségének kontrollhoz viszonyított értékével (<http://www.pitt.edu/~super1/lecture/> nyomán módosítva).

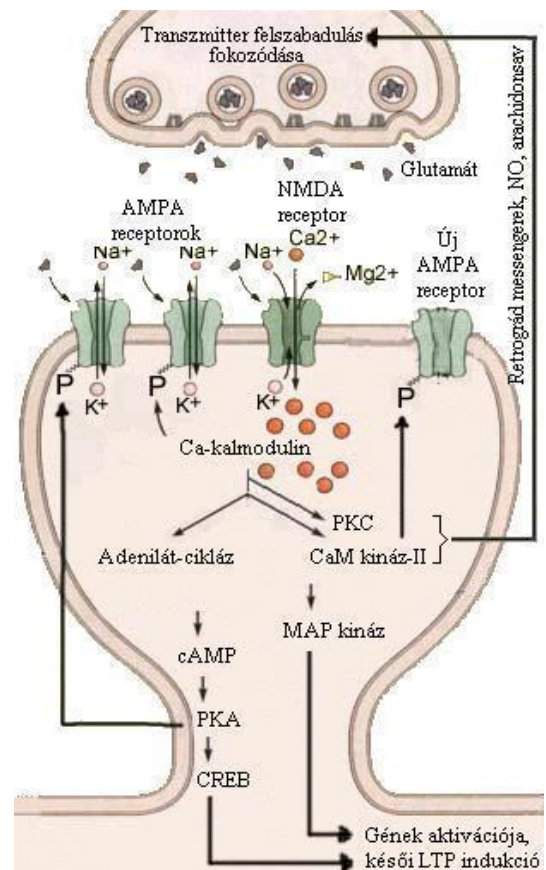
és gátlástól. Az LTP-t, vagyis a hosszú távú szinaptikus hatékonyság fokozódását indukálhatják egy nagy frekvenciás ingerléssel (HFS, high frequency stimulation), vagy theta burst stimulációval is, melyek a szinaptikus válasz gyors és stabil növekedését váltják ki. Ennek időbeli lefutása több óra is lehet, vagyis ez az időtartam összemérhető az agyszelet preparátum életidejével (Shors és mtsai., 1997) (6. ábra). A legtöbb LTP kísérlet, beleértve az intra- és az extracelluláris elektrofiziológiai méréseket is, az AMPA receptorok közvetítette szinaptikus transzmisszió megfigyelésén alapszik. Intracelluláris

mérések során a poszt-szinaptikus sejtől vezethetünk el megnövekedett amplitúdójú EPSP-t, vagy extracellulárisan sejtpopulációra kiterjedő elektrofiziológiai történés regisztrálásakor a fEPSP változását. Az EPSP-spike potencírozódás egy adott mértékű EPSP okozta akciós potenciál növekedésre, egy meghatározott méretű fEPSP esetében pedig ennek megfelelően a population spike amplitúdó növekedésére utal. A szinaptikus és az EPSP-spike potencírozódás más mechanizmus alapján működik, ezért nem tanácsos LTP mérése közben az fEPSP-spike-ot mérni (Bortolotto és mtsai., 1993; Isaac és mtsai., 1998).

A nagy frekvenciás ingerlés időbeli hossza és frekvenciája, theta burst esetében pedig a burst-ök frekvenciája és a köztük eltelt idő jelenti azokat a paramétereket, amelyek megszabják a plaszticitás növekedésének mértékét és időbeli lefutását. Az LTP kialakulásának feltétele, hogy teljesüljön a kooperativitás, az asszociativitás, a bemenet-specifikusság, valamint a tér- és időbeli kapcsolat. A kooperativitás azt jelenti, hogy minimális számú axonnak együtt kell aktiválódnia. Az asszociativitás a különböző erősségű ingerek társítását jelenti, vagyis ha egy gyengébb ingert társítunk egy erősebbel, akkor később a gyenge ingerre is nagyobb választ kell kapnunk. A bemenet-specifikusság ennek a társítási folyamatnak a pontosságát jelenti, vagyis azt, hogy csak az a szinaptikus kapcsolat erősödik meg, amelyik az ingerek társításában részt vett.

A tér- és időbeli kapcsolat arra utal, hogy az intracelluláris folyamatok lecsengési időtartományán belül kell találkozni a két társítani kívánt ingernek is.

Az LTP, típusát tekintve, lehet asszociatív és nem-asszociatív. Az asszociatív forma NMDA-függő, és ebből kifolyólag pre- és poszt-szinaptikus változások is történnek a két szinapszis társítása során, tehát a folyamat önmagát tekintve heteroszínaptikus (Kandel és mtsai., 1982).



7. ábra: Az LTP preszinaptikus és poszt-szinaptikus eseményei. (<http://www.aboutmind.com/memory-brain-neurons nyomán módosítva>)

A monoszinaptikus nem-asszociatív forma NMDA-független, egyszerűen egy inger ismételt adása váltja ki, ami preszinaptikus transzmitter felszabadulás fokozódást idéz elő (Kandel és mtsai., 1982).

A rövid távú potencírozódást vagy a páros impulzussal történő serkentést már sok szinapszison megfigyelték, és mint kiderült, a Ca^{2+} koncentráció és a transzmitter felszabadulás nem lineáris összefüggésén alapulnak (Kandel és mtsai., 1982). Az asszociatív LTP tetanikus ingerléssel kiváltott indukciója után a preszinaptikus sejtől neurotranszmitterként felszabaduló Glu a posztzinaptikus sejt glutamáterg ioncsatornához kötődve Ca^{2+} beáramlást eredményez az intracelluláris térbe. A megnövekedett koncentráció lehetővé teszi a Ca-kalmodulin aktiválását. A Ca-kalmodulin függő CaM kináz-II és a PKC aktivitása együtt hozzájárul a retrográd messengerek felszabadulásához a posztzinaptikus sejtől, amelyek a preszinaptikus sejt transzmitter leadását fokozzák (Kandel és mtsai., 1982). Ilyen retrográd messengerek a nitrogén-monoxid és az arachidonsav. A PKA aktivitása az AMPA receptorok foszforilációja, amely azok megnövekedett nyitva tartását eredményezi a Glu bekötődése után. Ezenkívül a PKA aktivitásának másik célpontját képezik a “cAMP respond element binding” (CREB) fehérjék, amelyek az új AMPA receptorok génjeinek transzkripcióját fokozzák. Következő lépésként az új glutamáterg AMPA receptorok expresszálódnak, amelyeket a Ca^{2+} ionok aktiválta Ca-kalmodulin kináz rögzít a membránon foszforiláció segítségével. Ez segíteni fogja a koincidencia faktorként működő NMDA receptorok Mg^{2+} blokkjának eltávolítását - amely addig a Ca^{2+} ionok beáramlását gátolta a csatornán keresztül -, ugyanis az AMPA receptorok biztosítják az akciós potenciál létrejöttét a rajtuk keresztül átfolyó Na^+ ion beáramlással. Az akciós potenciál által okozott depolarizáció kilöki az NMDA receptor Mg^{2+} blokkját, majd a bekötődő Glu kinyitja az ioncsatornát, és a Ca^{2+} ionok szabadon beáramolhatnak a citoszolba (Kandel és mtsai., 1982) (7. ábra).

A stabilizálódás fázisában érvényesül a Ca-kalmodulin MAP kináz aktivitás-növelő hatása, amely a génexpresszió modulálásán keresztül segíti a szinaptikus fehérjék szintézisét, melyeket a protein kinázok által elvégzett foszforiláció tesz majd alkalmassá a szinapszisok felépítésére. A késői LTP során a szinaptikus felület megnő, majd a perforációt követően elágazik, és új szinapszist hoz létre. Mindezt a génexpresszió és fehérjeszintézis fokozódása is kíséri. Időbeli felosztásban a korai, vagy átmeneti fázis az LTP expresszióját jelenti, a retrográd messengerek és az újonnan expresszált AMPA receptorok megjelenésével bezárólag; a késői, vagy stabil fázis a stabilizálódást és az új szinapszisok keletkezését foglalja magában (Kandel és mtsai., 1982).

2. Célkitűzés

1. A 4VO műtét alkalmazása során - nem várt módon - jelentős különbségeket fedeztünk fel a Wistar és a Sprague-Dawley (SD) patkánytörzsek között. Ismert az, hogy a két törzs között jelentős eltérések tapasztalhatók magatartás vizsgálatokban, a tanulás és memória folyamataiban, valamint enzimatis aktivitás és génexpresszió szintjén is. Feltevésünk szerint, a két törzs vaszkuláris anatómiája is jelentős mértékben különbözik, ebből adódóan a 10 perc globális agyi ischaemia más jellegű kérgi elektromos aktivitást és eltérő mértékű sejtszintű károsodást eredményez a két törzs idegrendszerében. **A műtéti beavatkozások során tapasztalt különbségek tisztázására ezért *in vivo* elektrofiziológiai méréseket (elektrokortikogram, ECoG regisztrálása) és hisztológiai festéseket (Fluoro Jade C, Evans Blue és Cresil-ibolya) végzünk.**

2. Az oxálecetsav neuroprotektív hatásának vizsgálatát Wistar 4VO modellen végezzük. A védő hatást a 4VO ischaemiás inzultus következtében lecsökkenő szinaptikus plaszticitás révén követjük figyelemmel *in vitro* elektrofiziológiai mérésekkel. Korábbi eredményeink alapján ismert, hogy az oxálecetsav képes mérsékelni az ischaemiás inzultust követő plaszticitáscsökkenést. Az oxálecetsav dózisának csökkentése érdekében egy másik endogén természetű anyag, a dehidroepiandroszteron neuroprotektív hatását is teszteljük, és a két endogén természetű anyaggal kombinált kezelést adunk a 4VO műtétet elszenvedett kísérleti állatoknak. **Az oxálecetsav védőhatását *in vivo* elektrofiziológiai kísérletekkel (elektrokortikogram regisztrálása) is vizsgáljuk, a kombinált kezelés alkalmazhatóságát *in vitro* elektrofiziológiai eredményekkel (LTP kiválthatósága és fenntarthatósága) támasztjuk alá.**

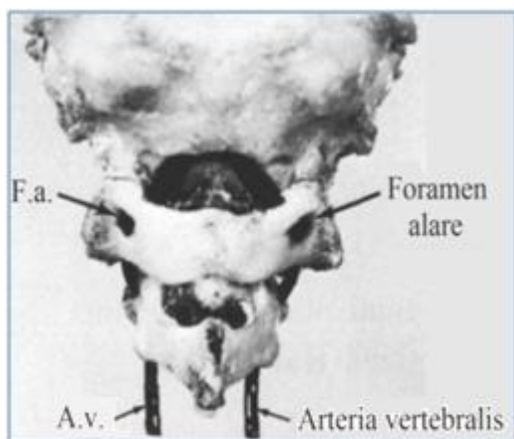
3. Anyagok és módszerek

3.1 Felhasznált állatok

Kísérleteim során 180-280 g tömegű (N=80) hím Wistar és hím SD (N=20) patkányokon végeztem el a méréseimet. A vizsgálatok során felhasznált állatokat külön erre a célra kialakított állatházban tartottuk szabványos műanyag ketrecekben. Az állatházi szobában 12:12 órás sötét-világos periódust és 23 °C hőmérsékletet biztosítottunk. Az állatoknak szabad, korlátlan hozzáférésük volt vízhez és élelemhez (CRLT/N rágcsálótáp). Szigorú etikai kritériumokat szem előtt tartva, minden lehetséges módon megpróbáltuk minimalizálni az állatok szenvedését és a felhasznált állatok számát. A kísérletek során minden esetben a laboratóriumi állatok gondozásával kapcsolatos alapelvek (NIH Publikáció No. 85-23), a Magyar Egészségügyi Bizottság által jóváhagyott állatgondozással kapcsolatos protokoll (1998) és az Európai közösségek Tanácsának 1986. november 24-i rendelete (86/609/EEC) szerint jártunk el.

3.2 A 4VO ischaemiás modell

A 4VO (4-vessel-occlusion) módszerrel tranziens globális ischaemiát idéztünk elő Napentobarbitállal (60 mg/kg, i.p.) altatott Wistar és SD patkányokon (Pulsinelli és mtsai.,

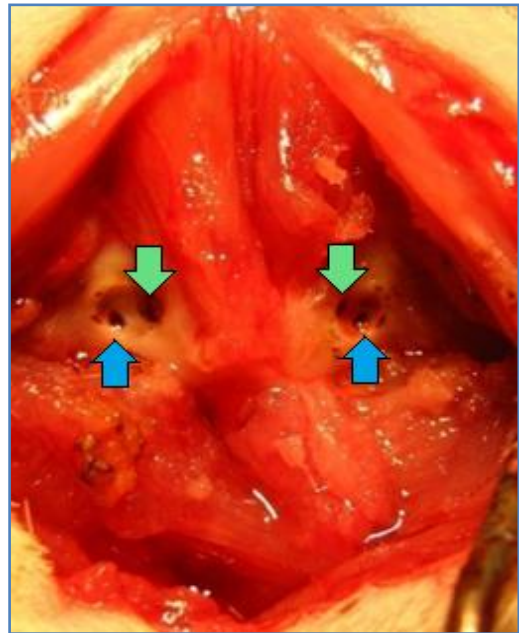


8. ábra: Az atlasz csigolya; a foramen alare elhelyezkedése és az arteria vertebralisok (Pulsinelli 1979 nyomán módosítva)

1979). A 240-280 g testsúlyú állatokat a műtét első napján elaltattuk, majd sztereotaxiás készülékben (David Kopf. Instruments, Tujunga, USA) rögzítettük. A befogás után a fej előrebillentésével hozzáférhetővé tettük az állatok tarkóját. A bőr és az alatta lévő izom felnyitása után a mélyebben fekvő izmokat csipesszel tompán szétfejtettük, sebterpesszel kitámasztottuk. Az atlasz csigolya megtisztításával mindkét oldalon láthatóvá vált a foramen alare, amelyen keresztül a

csigolyatestből a csigolyafelületre emelkedik egy leágazó artéria (8. ábra). Sztereomikroszkóp alatt elektrokauter segítségével a foramen alare-ban roncsoltuk a benne

futó arteria vertebralist. Az égetés, hűtés és tisztítás felváltva követték egymást, egészen addig, amíg a kialakult furatban az arteria vertebralis egykori foramen alare-ba érkező és onnan távozó szakaszának elégetett, zárt végei fel nem tűntek (9. ábra). Ezt követően a sebet fertőtlenített varrocénnával zártuk. Az irreverzibilis érelzárást 1 nappal később követte a kétoldali CCA tranziens okklúziója, szintén Napentobarbitál (60 mg/kg, i.p.) altatásban. A carotisokat megtisztítottuk a vagoszimpatikus idegkötegtől, valamint a preparálás közben már a farokvénát is előkészítettük az intravénás anyagbeadásra. A verőereken áthaladó vér színének megfigyelésével az állat aktuális állapotát ellenőriztük. Ha azt élénkörösnek láttuk, vagyis az altatás nem volt túlzottan mély, és így légzésdeprimáció sem volt, akkor sérülést nem okozó ércsipeszekkel 10 percre elszorítottuk a nyaki ütőereket (10. ábra). Az álműtött állatok



9. ábra: A kipreparált atlasz csigolya, és mindkét kifűrt foramen alare, benne az arteria vertebralis bemenő (kék nyíl) és kimenő, agy felé futó ágának (zöld nyíl) zárt végeivel. (FJ saját ábrája)



10. ábra: A kétoldali arteria carotis communis kiemelve és reverzibilisen elszorítva. (Four-vessel occlusion manual by Joseph Burda)

esetében nem történt meg a kétoldali CCA leszorítása. A carotis elszorítás következtében kialakuló globális agyi ischaemiát, több, szabad szemmel is látható változás jelezte: a pupilla kitágulása, a cornea reflex megszűnése, továbbá a „righting reflex” hiánya – ilyenkor az állat nem fordul vissza a hátáról a hasára –, végül pedig az enyhe fájdalomingerre való reakció teljes hiánya. Ebben az állapotban néhány másodperc után az ECoG is izoelektromossá válik. A 10 percig tartó globális ischaemia ideje alatt 37°C-on tartott fűtőlapon feküdt az állat. Az oxigénhiányos periódus végén eltávolítottuk az atraumatikus érszorítókat

mindkét CCA-ról. Az *in vitro* kísérleteknél 8 nap túlélés után következett a dekapitáció és a hippocampális agyszelet-preparátumok elkészítése. A hisztológiai festéseknél 8 nap

túlélés után az állatokat transzkardiálisan perfundáltuk, az agyat kiemeltük, és paraformaldehiddel utófixáltuk. Az *in vivo* ECoG kísérleteknél nem volt több napos túlélés.

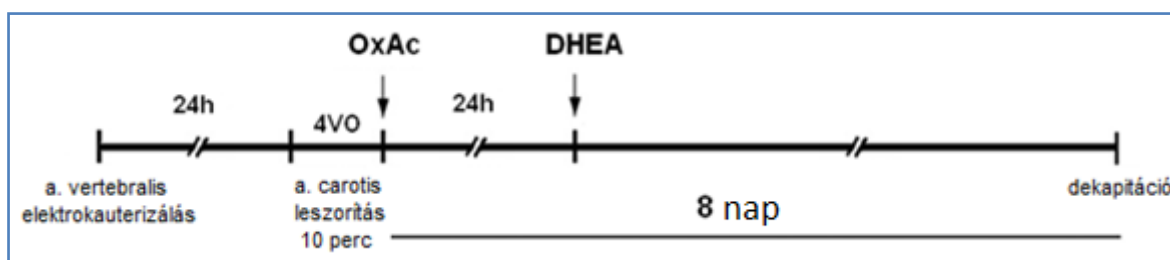
3.3 Hatóanyagok dozírozása, kezelés

Oxálecetsav

Az oxálecetsavat (Sigma, Németország) TBS-ben oldottuk fel, és a pH-t 7.3-ra állítottuk be 10 N-os nátrium-hidroxiddal. A végtérfogat 1 ml volt. Az oldatot 66 µl/perc sebességgel egy mikrodialízis pumpa segítségével közvetlenül a reperfúzió kezdetétől adtuk be az állatok farokvénájába (11. ábra). Kétféle dózist alkalmaztunk: az alacsony dózis (Kis dózis OxAc) 4 mg/100 g, a magas dózis (Nagy dózis OxAc) pedig 20 mg/100 g volt.

Dehidroepiandroszteron

A dehidroepiandroszteron (DHEA) (Sigma, Németország) 97 %-os abszolút alkoholban oldottuk fel, és kukoricaolajban (Sigma, Germany) diszpergáltuk, az oldat koncentrációja 10 mg/ml lett. Ebből az oldatból adtunk 2 mg/100 g mennyiséget, ami a 250 g testtömegű állatoknál 0.5 ml végtérfogatban került beadásra (i.p.) 1 nappal a 10 perces tranzienis globális ischaemia után (11. ábra).

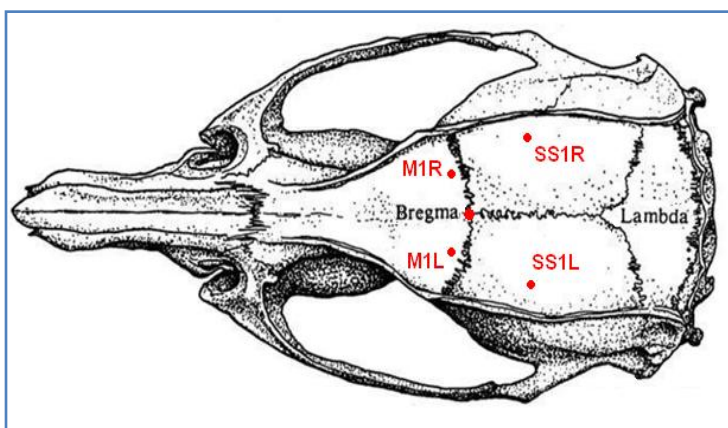


11. ábra: Az oxálecetsav és DHEA kezelés valamint a 4VO műtét és a 8 napos túlélés időbeli elrendezése (FJ saját ábrája)

3.4 *In vivo* elektrofiziológia

A 250-300 g tömegű Wistar és SD állatokat Na-pentobarbital (60 mg/kg i.p.) altatásban készítettük elő az extradurális ECoG regisztrálásához. Sztereotaxiás készülékben (David Kopf. Instruments, Tujunga, USA) rögzítettük az állat fejét. A fejbőrön ejtett bemetszés mentén felnyitottuk azt, és a csonthártya eltávolításával szabaddá tettük a koponya felszínét. Sztereomikroszkóp alatt fűrés segítségével nyitottuk meg a koponyát a primer motoros (M1R/L) kéreg és a primer szomatoszenzoros (SS1R/L) kéreg fölött. Az említett

kérgi területek sztereotaxikus koordinátái: M1R/L (jobb/bal oldali primer mozgató kéreg): 1,7 mm anterior és 3 mm laterális irányban; SS1R/L (jobb/bal oldali primer szomatoszenzoros kéreg): 3 mm poszterior és 5 mm laterális irányban a Paxinos-féle patkány agyatlasz adatainak megfelelően (Paxinos és mtsai., 1980) (12. ábra). A dura mater

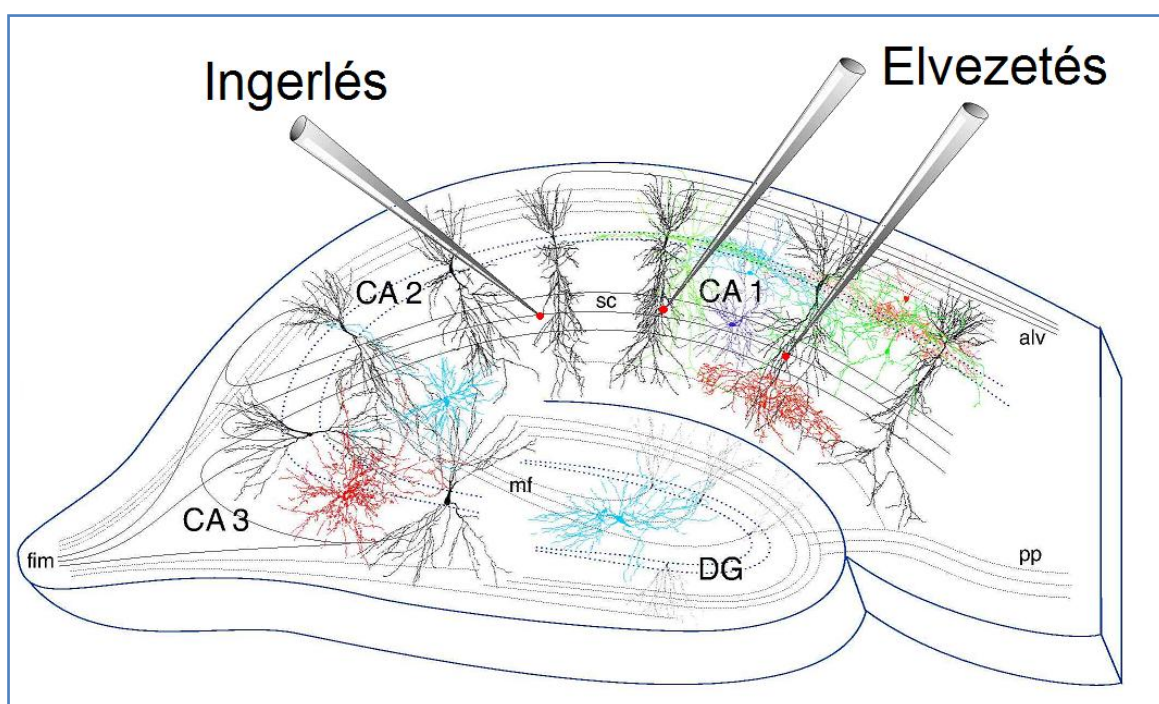


12. ábra: Patkány koponya az ECoG rögzítéséhez használt sztereotaxikus pontok jelölésével. Az M1R és M1L a jobb és bal primer motoros kérget, az SS1R és SS1L a jobb és bal primer szomatoszenzoros kérget jelöli (Paxinos és mtsai., 1980 nyomán módosítva).

megsértése nélkül mind a négy furatba gömbfejú ezüst elektródokat helyeztünk. Az elektródok teljes vezető felületének kihasználása érdekében kontakt gélrt vittünk fel az ezüstfejek felszínére. Az elektródokat egy 8 csatornás elektroencefalográfhoz csatlakoztattuk (EEG 8S-4769, Medicor, Magyarország). Egy közös referencia elektróddal szemben folyt a mérés, amely a koponya középvonalán volt elhelyezve 5 mm távolságra a bregmától anterior irányban. Az első 15 perc kontroll periódus rögzítése után 10 perc 4VO-t alkalmaztunk az ECoG folyamatos regisztrálása mellett, az ezt követő reperfúzióból pedig további 50 perces szakaszt rögzítettünk. A mintavételezési frekvencia 200 Hz volt, az aluláteresztő szűrő 70 Hz-re, a felüláteresztő szűrő pedig 1 Hz-re volt állítva. Az elektrofiziológiai adatokat Axon Digidata 1200B konverterrel digitalizáltuk, és Axoscope 8.0 (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA) rendszer segítségével regisztráltuk, majd számítógépen tároltuk. Az adatok off-line elemzését MATLAB 2010b és Stimfit 0.10 programok segítségével végeztük.

3.5 *In vitro* elektrofiziológia

A patkányok dekapitálása után vibratómmal (Campden Instruments, UK) 350 μm vastagságú koronális szeleteket készítettünk a hippocampus bregma -3,3 és -4,3 mm közötti részéből. A metszést jéghideg, 2-5°C-os mesterséges cerebrospinális folyadékban (aCSF) végeztük, melynek összetevői mM-ban megadva az alábbiak voltak: 130 NaCl, 3,5 KCl, 1 NaH_2PO_4 , 24 NaHCO_3 , 1 CaCl_2 , 3 MgSO_4 és 10 D-glükóz, melyet karbogénnel (95 % O_2 , 5 % CO_2) telítettünk a szeletek zavartalan oxigén ellátása érdekében. A szeleteket ezután egy Haas-típusú regisztráló kamrába helyeztük, majd ott szobahőmérsékleten inkubáltuk egy órán át, hogy azok a regisztráció közben használt oldatban pihenjenek. A



13. ábra: Az *in vitro* elektrofiziológiai mérések kísérleti elrendezése koronális hippocampális agyszeleten (<http://www.stanford.edu/group/maciverlab/hippocampal.html> nyomán módosítva)

regisztráló folyadék összetétele két értékben eltért a metszésnél használttól, u.i. 3 mM CaCl_2 és 1,5 mM MgSO_4 -ot tartalmazott. A folyadék áramlási sebessége 1,5-2 ml/perc volt, és a kísérletek 34°C-on zajlottak. Az ingerlő elektródot a CA1 és CA2 régió határához közel fekvő stratum radiatum-ba helyeztük. Orthodromikusan ingereltük a Schaffer-kollaterálisokat állandó áram mellett, 0,3 ms-os impulzusokkal, 0,05 Hz frekvenciával. A field-EPSP-eket a stratum radiatum-ból vettük fel (13. ábra). A kísérlet során 1-2 MOhm ellenállású, regisztráló folyadékkal feltöltött mikroelektródokat használtunk, amelyeket földelt, magas bemenő ellenállású bemenet segítségével egy előerősítőhöz kapcsoltunk százszoros erősítés és 5 KHz-es felső szűrő alkalmazása mellett. A teszt stimulus

intenzitását itt 30-60 μA közti értékre állítottuk be abból a célból, hogy az ingerlés a kontroll szeletekben a maximális EPSP-t kiváltó minimális impulzus intenzitásnak körülbelül az 50 %-a legyen. A 4VO után 8 nappal készített agyszelet preparátumokon végzett kísérletekben az ingerlésre egy titánium-irídium ötvözetből készült koncentrikus bipoláris fém elektródot használtunk (Neuronelektrod Kft, Budapest). A CA1 piramissejtek apikális dendritjei és a Schaffer-kollaterálisok közti szinapszisok hosszú távú potencírozására theta burst (TBS) ingerlést alkalmaztunk. A 40 ms hosszúságú 100 Hz frekvenciájú 4 db impulzusból álló burst-öket 350 ms-os szünet választotta el egymástól. Összesen 20 db burst-tel, vagyis 80 db impulzussal indukáltuk az LTP-t a tesztstimulus 100 %-os intenzitása mellett. A theta burst után az EPSP változásait 60 percen keresztül követtük. Az alapvető glutamáterg szinaptikus működés felmérésére I/O (bemenet/kimenet) görbéket regisztráltunk. Az EPSP-k digitalizált formában kerültek elmentésre egy Digidata 1200 konverter és egy Axoscope 10.0 (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA) regisztráló rendszerrel ellátott számítógépen. Az elmentett adatok kiértékelését pedig az Origin 6.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) program segítségével végeztük.

3.6 Hisztológia

A 10 perces globális agyi ischaemiát követően, 8 nap túléléssel az állatokat 4 %-os klorálhidrát oldat intraperitoneális injekciójával túlaltattuk, és transzkardiálisan perfundáltuk 0,1 M koncentrációjú jéghideg foszfátpufferrel (PBS, pH=7,4), majd 4 %-os paraformaldehiddel. Az állatok agyát kiemeltük, és 4 %-os paraformaldehidben 4 $^{\circ}\text{C}$ -on posztfixáltuk egy éjszakán át, majd 20 μm vastagságú koronális metszeteket készítettünk a bregma -2,3 mm-től -4,3 mm-ig terjedő sztereotaxikus koordináták között. A metszeteket 2 %-os zselatinnal bevont tárgylemezre húztuk fel.

Fluoro Jade C

A neuronális degeneráció láthatóvá tételéhez Fluoro Jade C (Chemicon, Millipore Ltd, Magyarország) festést alkalmaztunk, amely nagy szelektivitással festi meg a degenerálódott neuronok szómáját, dendritjeit, axonjait és axonterminálisait is (Schmued és mtsai., 2005). Az erre a festésre szánt metszeteket lefedtük Fluoromount-tal, és sötét helyen tároltuk. A Fluoro Jade C festett metszeteket fluoreszcens mikroszkóp alatt

vizsgáltuk (BX51, Olympus, Tokio, Japán). A fluoreszcens fény gerjesztési hullámhossza of 470–490 nm, az emisszió hullámhossza 520 nm volt.

Cresil-ibolya

A Cresil-ibolya (Sigma, Németország) festést, amely az intakt sejteket képes megfesteni, annak a leggyakrabban alkalmazott 1 %-os szűrt oldatával végeztük. A felhasznált oldatok, sorrendben a hozzájuk tartozó mosási időikkel, az alábbiak voltak: 95 %-os etanol 15 percig, 70 %-os etanol 1 percig, 50 %-os etanol 1 percig, desztillált víz 2 percig, desztillált víz 1 percig, Cresil-ibolya 1 %-os oldata 5 percig, desztillált víz 1 percig, 50 %-os etanol 1 percig, 70 %-os etanol 2 percig, 95 %-os etanol 2 percig, 100 %-os etanol 1 percig.

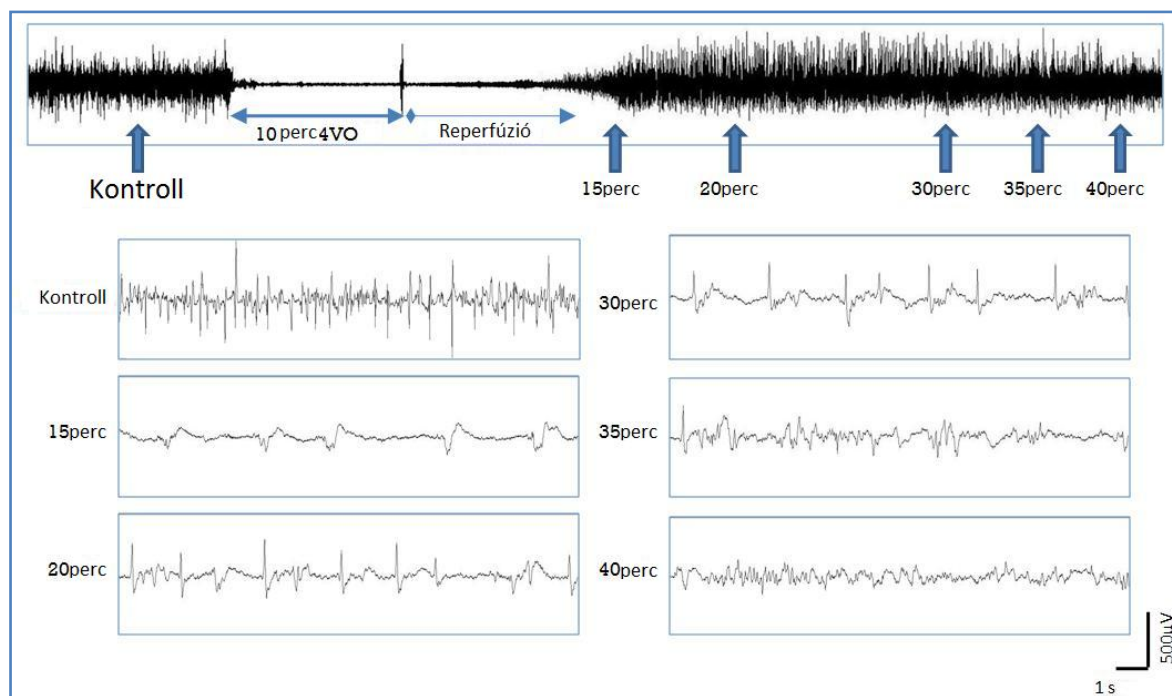
Evans Blue festés

Evans Blue festést a permanens 4VO műtéten átesett állatokon végeztünk. Ez a beavatkozás, főbb lépéseit tekintve megegyezik a 4VO modellel. Annyi változtatást tettünk, hogy az arteria vertebralisok elektrokauterizációja után, 24 óra eltelte nélkül rögtön elvégeztük a kétoldali CCA lezorítást is. Ezt úgy tettük, hogy mindkét nyaki verőérre két ligatúrát helyeztünk fel, amelyek megszorítása után az artériákat a két kötés között elvágtuk, kizárva ezzel a szivárgás lehetőségét. Abból a célból, hogy az esetlegesen az erekben maradt vér ne befolyásolja az Evans Blue festődés intenzitását, transzkardiálisan perfundáltuk az állatot 0,1 M koncentrációjú jéghideg foszfátpufferrel (PBS, pH=7,4), ezután következett az 50 ml 3 %-os Evans Blue fluoreszcens festék perfúziója. Az agyat rögtön a festés után eltávolítottuk, és egy éjszakán át utófixáltuk 4⁰C-on. Az agyakból 20 µm vastagságú szeleteket készítettünk az *in vivo* elektrofiziológiai mérés elektródáinak megfelelő sztereotaxikus koordináták helyeiről. A metszeteket 2 %-os zselatinba mártott tárgylemezre húztuk, és lefedtük Fluoromount-tal, majd sötétben tároltuk. A fluoreszcens metszeteket (BX51, Olympus, Tokio, Japán) fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáltuk. A fluoreszcens fény gerjesztési hullámhossza of 470–490 nm, az emisszió hullámhossza 520 nm volt.

3.7 Adatelemzés

3.7.1 BSR analízis

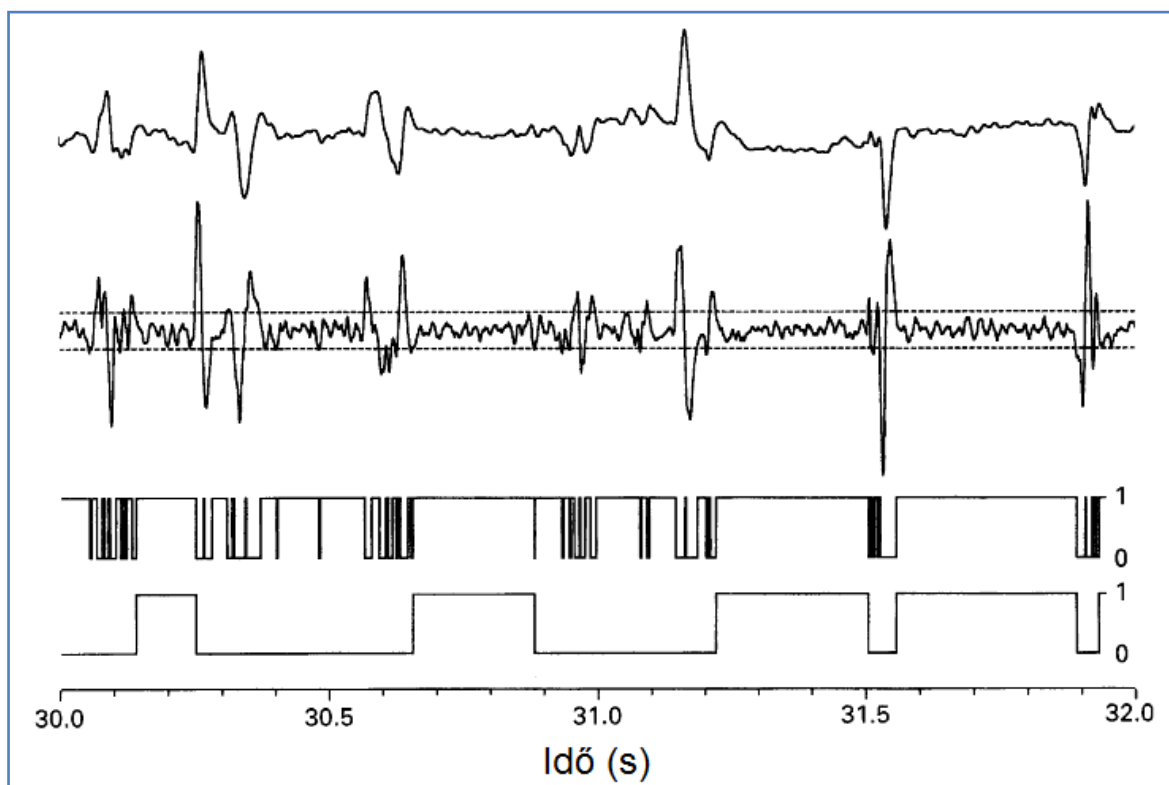
A 4VO állatok epidurális ECoG hullámmintázata, az ECoG kontroll szakaszán tapasztalható tüzelési sűrűséghez és amplitúdókhoz viszonyítva jelentős különbségeket mutat a reperfúzió első tüzelés (FB, first burst) utáni szakaszának különböző időpillanataiban. Az ischaemiás állapotban jelentkező "szakaszos" kérgi aktivitást



14. ábra: Transziens globális ischaemia epidurális ECoG regisztrátuma Wistar patkány primer szomatoszenzoros kérgén. A 10 perces kétoldali CCA leszorítás utáni reperfúzió 15., 20., 30., 35., 40. percében láthatók az ECoG hullámok 10 másodperces szakaszai; a tüzelő és a csendes szakaszok alternáló megjelenése. (FJ saját ábrája)

alternáló, tüzeléstől mentes, vagyis csendes (supression), és aktív (burst) szakaszok alakítják ki (14. ábra). Az eltérő karakterű szakaszok meghatározott periódusokon belüli százalékos arányát (BSR, burst supression ratio) a csendes szakaszok százalékos előfordulásával adtuk meg (Rampil és mtsai., 1992). A küszöb feletti tüzelés azonosítására Vijn és Sneyd módszerét használtuk (Vijn és mtsai., 1998). A módszer "0"-át, vagy "1"-et rendel az ECoG minden pontjához, így a módszer alkalmazásával az ECoG-ból egy bináris adatsort lehet előállítani. Az elemzés felbontása 10 s volt. Az áttekinthetőség és az egyszerűbb további felhasználás érdekében az elemzéskor, a két hozzárendelhető értéket egymástól elválasztó küszöbérték mellett, az úgynevezett csúszóablakot alkalmaztuk. Ennek az volt a funkciója, hogy segítségével a csúszó ablak időszakaszán belül újra

bekövetkező, azonos hozzárendelt értékű eseményeket összevonjuk. A csúszóablak hossza 200 ms volt, ami azt jelenti, hogy a kerge aktivitás feszültségküszöböt átlépő eseményei és az ezt 200 ms-on belül követő újabb küszöb feletti események közötti ECoG szakaszhoz is "0"-át rendel az elemző algoritmus (15. ábra). Az adatokat 1.5-50 Hz-es sávszűrővel szűrtük, mert a 10 perc 4VO-t követően az FB előtti szakaszon, egy körülbelül 1.5 Hz frekvenciájú hullám volt látható, ami csökkentette volna az analízis érzékenységét. A BSR

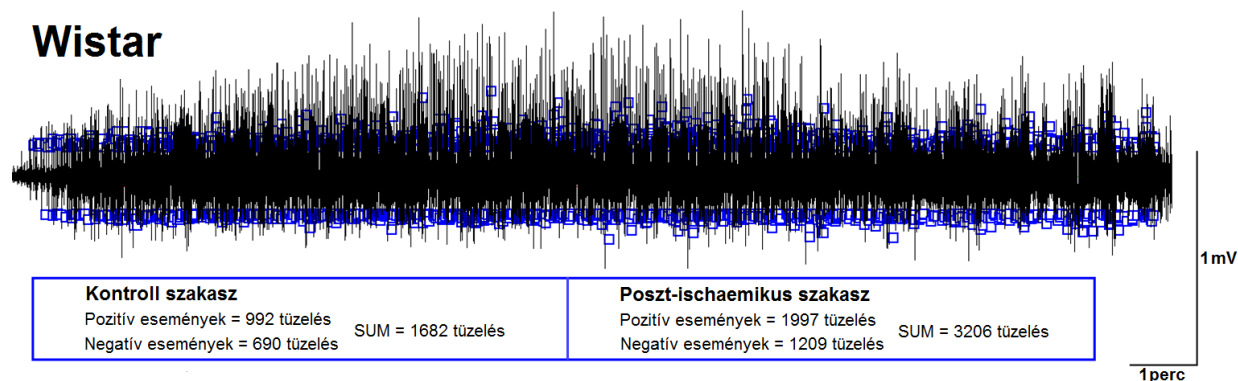


15. ábra: Vijn és Snejd módszere az ECoG bináris adattá alakításához (Vijn és Snejd, 1998 nyomán módosítva)

meghatározáshoz a feszültségküszöb értékét addig csökkentettük egy 5 perc hosszúságú kontroll ECoG szakaszon, amíg az nem eredményezett 5 %-nál kisebb BSR-t, ez átlagosan 20-25 μV körüli érték volt. Az analízis érzékenységét tovább növelendő, minden állat valamennyi ECoG csatornáján külön elvégeztük az 5 perc kontroll szakaszhoz való viszonyítást, ezzel kiküszöbölve a kísérleti körülményekből adódó csatornák közti eltéréseket. Emellett a reperfúzió kezdete utáni és az első tüzelést még megelőző ECoG 1 perces szakaszán is elvégeztük a BSR elemzést, amely várhatóan 100 %-os eredményt adott. Ha ennél mégis kisebb BSR értéket kaptunk, akkor a küszöbfeszültséget a kontroll szakasz alapján meghatározott küszöb érték 20 %-ával növeltük, ezzel kiiktatva a kísérleti körülményekből adódó zaj torzító hatását. Ezután a kapott küszöbértékkel futtattuk le az elemzést az ECoG reperfúzió szakaszán, a kapott adatokat pedig az első tüzelés pillanatától használtuk fel és ábrázoltuk. Az analízis MATLAB 2010b-vel történt.

3.7.2 Küszöb feletti kérgi aktivitás számszerűsítése

A globális agyi ischaemiát követi egy burst periódus, amelynek lefutási ideje körülbelül 30 perc. Ebben a szakaszban nagyobb amplitúdóval és nagyobb gyakorisággal fordulnak elő ECoG tüskék. Az adatokat 1.5-50 Hz közötti sávszűréssel tettük alkalmassá a tüskeszám meghatározására. A poszt-ischaemikus burst periódusra jellemző nagyobb számú küszöb feletti elektromos esemény számszerűsítése céljából, a feszültség küszöb megállapítását a



16. ábra: 10 perc globális ischaemiát követő reperfúziós fázis FB utáni 30 perces szakasza; a poszt-ischaemikus burst periódus kezeletlen Wistar patkányban. A szomatoszenzoros kérgen a pozitív és negatív előjelű feszültségküszöböt átlépő aktivitás számszerűsítése Stimfit 0.10-ben. (FJ saját ábrája)

BSR analízis algoritmusával végeztük. Az elemzés felbontása itt is 10 másodperc volt. Az FB utáni 30-35 perc ECoG abszolút értékén végeztük el a BSR elemzést, többször megismételve azt, közben folyamatosan növelve a küszöbfeszültség értékét, amíg a BSR értéke el nem érte a >98 %-ot. Ezután az FB-t követő 30 perc ECoG tüske számát mértük meg (16. ábra), majd minden 5 perc ECoG tüske számát meghatároztuk, és elosztottuk az FB utáni 30-35 perces szakaszon kapott tüskék számával. Az elemzés MATLAB 2010b-vel és Stimfit 0.10-el történt.

3.7.3 Frekvencia-komponensek teljesítmény spektruma

Az ECoG adatokat az idő dimenzióból frekvencia dimenzióba alakítottuk diszkrét Fourier transzformációval, amely különböző frekvenciájú trigonometrikus függvényeket használ fel az időbeli összefüggések közelítésére. Welch módszerrel periodogramot készítettünk az ECoG különböző frekvenciákra vonatkozó teljesítmény spektrumának meghatározására. Minden regisztrált csatornán készítettünk teljesítmény spektrumot az FB utáni 5 perc ECoG-jának első 1 percére. A Welch periodogram számolásához a szegment hosszúság 300 adatpont volt 50 %-os átfedéssel. Az analízis MATLAB 2010b-vel készült.

3.7.4 Statisztikai analízis

Az LTP eredmények statisztikai analíziséhez a fEPSP amplitúdókat a 10 perc alapvonalon mérhető mezőpotenciál amplitúdók értékeihez normalizáltuk. A Shapiro-Wilk normalitásvizsgálat szignifikáns volt, vagyis az LTP adatok TBS utáni szakaszán nem mutattak normál eloszlást a fEPSP amplitúdó értékek, az elvégzett Levene-teszt alapján pedig a variancia homogenitás nem teljesült ugyanezen adathalmazra. A további elemzést ezért Kruskal-Wallis teszttel és két mintás nem-paraméteres Mann-Whitney U-teszttel végeztük. Az I/O görbék statisztikai analízise során szintén nem-paraméteres Kruskal-Wallis ANOVA tesztet végeztünk.

A BSR adatok normál eloszlását a 150-es elemszámmra való tekintettel Shpiro-Wilk teszttel vizsgáltuk meg, melynek szignifikáns lett az eredménye, tehát az adatok nem voltak normál eloszlásúak, emellett a Levene-teszt nem mutatott variancia homogenitást. Ennek megfelelően két független mintás nem-paraméteres Mann-Whitney U-tesztet alkalmaztunk a BSR adatok statisztikai analízisére. A feszültség küszöböt átlépő kérgi aktivitást számszerűsítő adatok normál eloszlást mutattak a Shpiro-Wilk teszt eredményei szerint, így egymintás T-próbát alkalmaztunk, hogy megállapítsuk a két csoport különbségeinek szignifikancia szintjét. A statisztikai analízist SPSS Statiscics 17.0 (SPSS Inc. Chicago, USA) programmal végeztük.

4. Eredmények

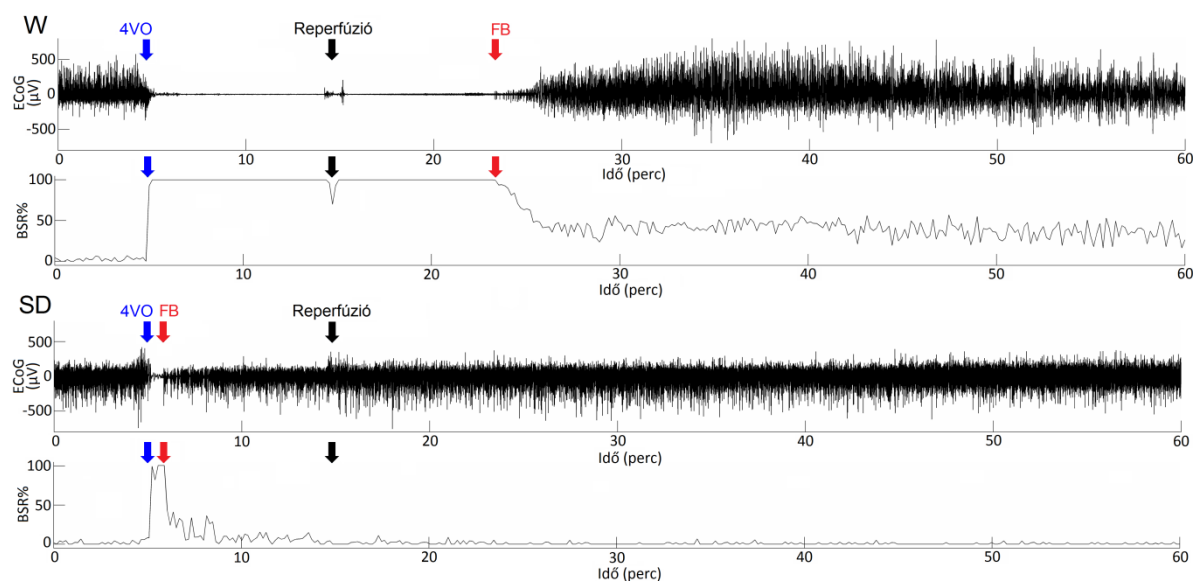
4.1 A Wistar és az Sprague-Dawley törzsek jellegzetes kéri aktivitása ischaemia alatt és után

A globális ischaemia kiváltására 4VO műtétet alkalmaztunk (Pulsinelli és mtsai., 1979). A neuroprotekciónak leghatékonyabb vizsgálatához az szükséges, hogy a sejtpusztulás és a kísérleti állatok mortalitása között a lehető legelőnyösebb egyensúlyt alakítsuk ki a különböző időtartamú globális ischaemiás inzultusokkal. A műtét gyakorlati részleteinek kidolgozásakor SD patkányokat használtunk fel, melyek a műtét első és második napján történő sebészeti beavatkozás során is Na-pentobarbital altatásban voltak. Az alkalmazott anesztetikum adagolásakor figyelembe kellett venni az állatok korát is, ami a Na-pentobarbital dozírozásához tartozó letalitási görbét jelentősen képes eltolni (Emmett B. Charmichael, 1937). A választott (60 mg/kg i.p) dózis a kísérletekhez felhasznált 250-300 g-os állatoknál megfelelő ideig biztosította a kellően mély alvást, így az előkészületeket, a preparálást és a 10 perc globális ischaemiát követően elegendő idő állt rendelkezésünkre a műtéti seb bezárására. A 20 perces, vagy annál hosszabb globális ischaemia kiváltása esetében ugyanezt a Na-pentobarbital dózist alkalmaztuk. A globális ischaemia tényleges kialakulásának jelei nem minden kísérleti állat esetében voltak megfigyelhetők, valamint előfordult az is, hogy a SD patkányok felébredtek az anesztetikum hatásának gyengülésekor, és visszafordultak a hasukra a 4VO közben.

Ezekből a megfigyelésekből arra következtettünk, hogy a 4VO módszer alapjait lefektető publikációkhoz felhasznált Wistar, és az általunk használni kívánt SD patkányok központi idegrendszeri vérellátásában alapvető különbségek lehetnek. A tényleges globális ischaemia kialakulását követően az ECoG izoelektromossá válik (Pulsinelli és mtsai., 1979). Kezdetben a műtéti módszer megfelelő alkalmazásának ellenőrzése céljából végeztünk validáló ECoG méréseket mind Wistar, mind pedig SD állatokon, ahol szintén az izoelektromos vonal megjelenését vártuk a globális agyi ischaemia 10 perces periódusában. A Wistar-ral szemben az SD állatok ECoG-ján egy csökkent amplitúdójú, de folyamatosan jelen lévő kéri aktivitás volt megfigyelhető (20. ábra). Több elemzésnek is alávetettük a két patkány törzsből rögzített ECoG adatokat.

4.1.1 BSR analízis

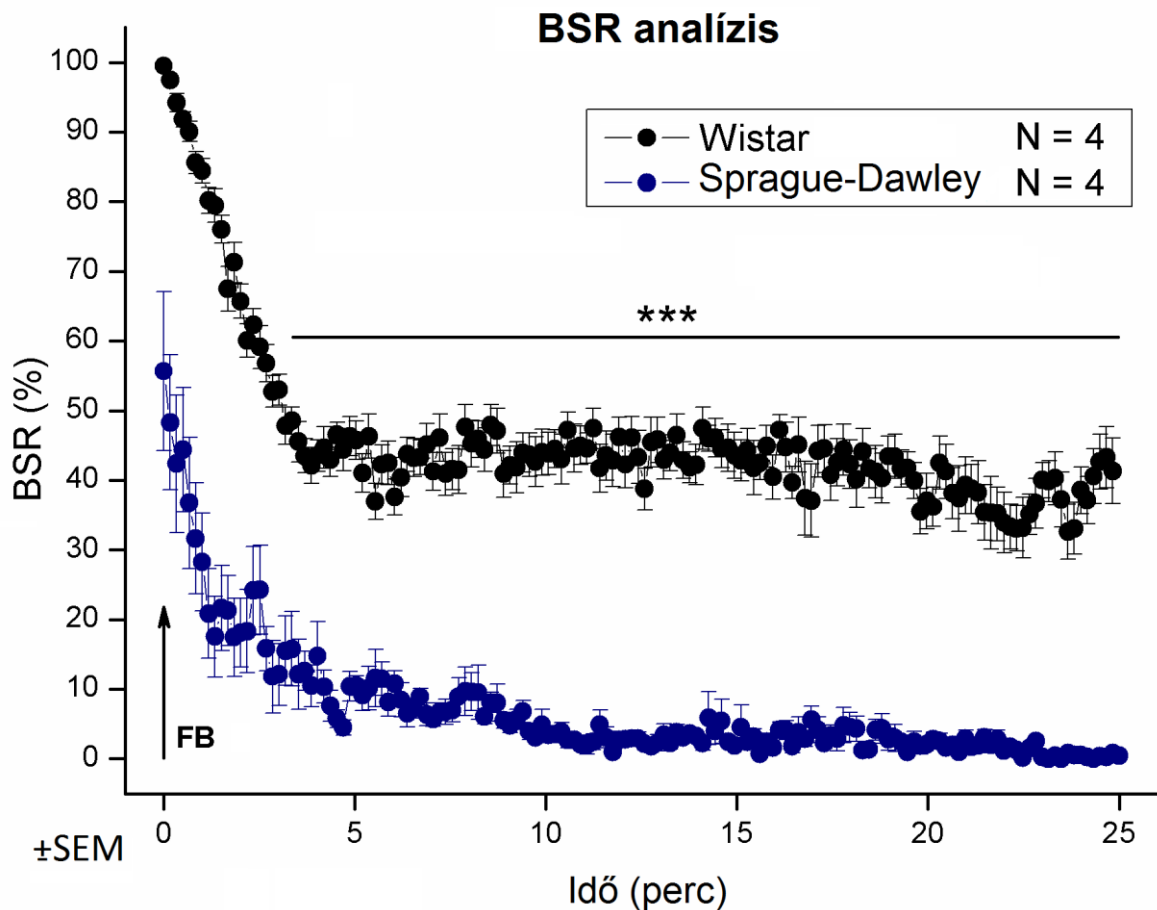
Megvizsgáltuk a burst suppression ratio (BSR) változását a Wistar és az SD állatok globális ischaemiás állapotában, valamint az ezt követő reperfúzió első 35 percében. A BSR analízist a Wistar és SD állatok regisztrátumain egyaránt lefuttattuk (17. ábra). A 10 perces globális agyi ischaemia kezdetekor a Wistar patkányok elektrokokortikogramja izoelektromossá vált, és a kétoldali CCA leszorítás közben végig az is maradt. Az



17. ábra: BSR analízis. Felül Wistar állat primer szomatoszenzoros kérgi területéről elvezetett ECoG látható kontroll, majd 10 perc 4VO globális ischaemia során és a reperfúzió fázisában. Az ECoG alatt a csatorna adataihoz rendelhető BSR értékeket a BSR% és az idő függvényében ábrázoltuk (W). Alul SD állat szintén primer szomatoszenzoros kérgéről elvezetett ECoG-ja látható a kontroll, 10 perc 4VO és reperfúzió szakaszában és alatta a regisztrátumhoz rendelhető BSR elemzés eredményét mutatjuk be a BSR% és az idő függvényében ábrázolva (SD). A kék nyíl a 10 perc 4VO kezdetét, a fekete nyíl pedig a 10 perc 4VO végét, a piros nyíl pedig az FB-t mutatja. (Fuzik és mtsai., 2012 nyomán módosítva)

atraumatikus ércsipeszek carotisokról történő eltávolítása után átlagosan 10-15 perc elteltével jelent meg az FB, majd a kérgi aktivitás heves tüzelésként, egy poszt-ischaemikus burst periódusként folytatódott. Ennek a rövid, ám megnövekedett amplitúdójú tüzelésekből és izoelektromos rövidebb szakaszok váltakozásából álló periódusnak átlagosan 25 perc volt a lefutási ideje. Az SD állatok esetében a 10 perces globális ischaemia első pár másodpercében vált kisebb amplitúdójúvá a kérgi aktivitás, illetve izoelektromossá az ECoG. Bizonyos esetekben az izoelektromos szakasz, vagyis a kérgi aktivitás szünetelése teljesen el is maradt, és a kérgi aktivitás amplitúdója sem csökkent jelentősen. Így az FB jóval a reperfúzió megkezdése előtt már megjelent. A kétoldali carotis leszorítás megszüntetésekor az ECoG amplitúdói a kontroll szakaszon mérhető amplitúdókhoz váltak hasonlóvá. Ezt igazolta a BSR% alakulása is, amely a Wistar patkányok esetében a 10 perces 4VO teljes ideje alatt 100 % volt, és a reperfúzió

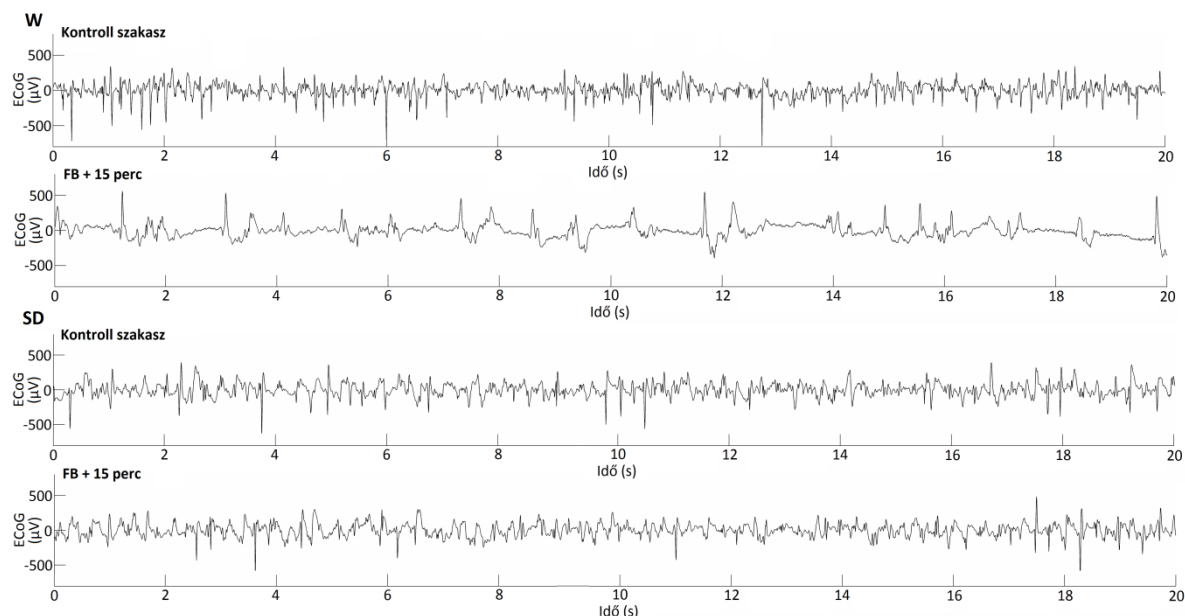
első 10-15 percében, az FB megjelenéséig szintén 100 %-os értéket ért el. Az FB-t követően a BSR% lecsökkent 40-50 % körüli értékre, és még 35 perccel később sem esett 35-40 % alá. Az SD állatok esetében a kontroll szakaszon 5 % alatti BSR értéket adó feszültség küszöbvel mérve, a 100 %-os értéket csak néhány pont erejéig érte el a BSR%, majd lecsökkent és a reperfúzió kezdetét megelőző 5 percben már 15 % alatti értékeket mutatott. A carotis véráramlásának újraindításával ez az érték 5 % alattira csökkent, vagyis



18. ábra: BSR analízis. A Wistar és az SD állatok BSR% értékei az idő függvényében az FB pillanatától ábrázolva. Minden állat esetében négy csatorna átlagából tevődtek össze az adatok. *** = $p \leq 0,001$ a neagatív kontrollhoz viszonyított szignifikancia szinteket jelölik. (Fuzik és mtsai., 2012 nyomán módosítva)

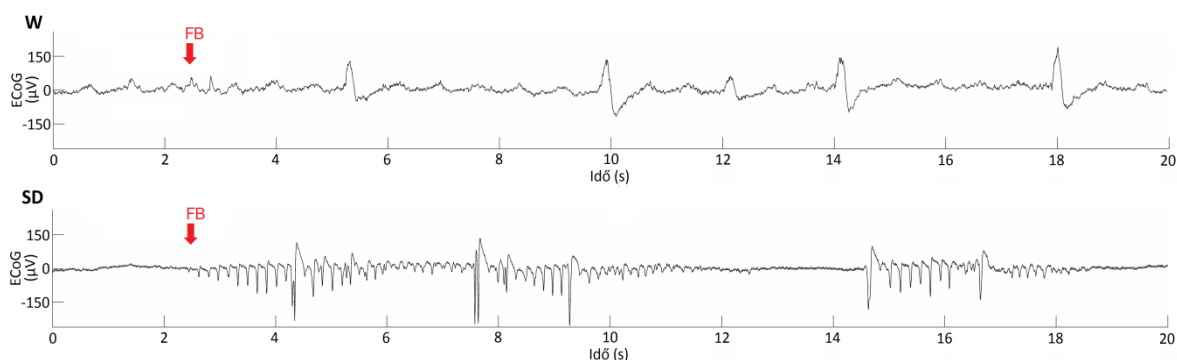
a kontroll szakasz BSR% értékeit mutatta. Érdekes megfigyelni a Wistar patkányok adataiból álló BSR% grafikont, és annak FB + 5 perctől FB + 25 percig tartó szakaszát, ahol a poszt-ischaemikus burst megnövekedett amplitúdójú tüzelései által kirajzolt ívet a BSR% adatai is követik (18. ábra). Tehát a legnagyobb amplitúdójú spike-ok a magasabb BSR% értékű időpillanatokban jelennek meg, ahol a leghosszabb izoelektromosnak tekinthető ECoG szakaszok alkotják a poszt-ischaemikus burst periódus szakaszos aktivitását. A Wistar és SD állatok BSR% eredményei között a különbség szignifikáns az FB utáni negyedik perctől kezdve.

A két Charles River törzs állataiból a globális ischaemia utáni reperfúzió során, az FB-től időben azonos távolságra, 15 percre regisztrált tipikus ECoG hullámformák jelentősen



19. ábra: Wistar és SD patkányok tipikus ECoG hullámformái FB + 15 percnél. A Wistar patkányok kontroll szakaszon és a poszt-ischaemikus periódusban megfigyelhető kérgi aktivitását ábrázoltuk felül (W). Az SD állatok kontroll szakaszban és FB utáni 15. percben regisztrált ECoG-ja alul látható (SD). (Fuzik és mtsai., 2012 nyomán módosítva)

különböznek egymástól. A Wistar patkányok esetében a nagy amplitúdójú tüzelések izoelektromos szünetekkel elválasztott hullámmintázatát figyelhetjük meg, amely jelentősen eltér a kontroll szakaszban látható hullámkarakterisztikától. Az SD állatok poszt-ischaemikus ECoG-ja ezzel szemben hasonló a kontrollhoz mind az amplitúdó, mind



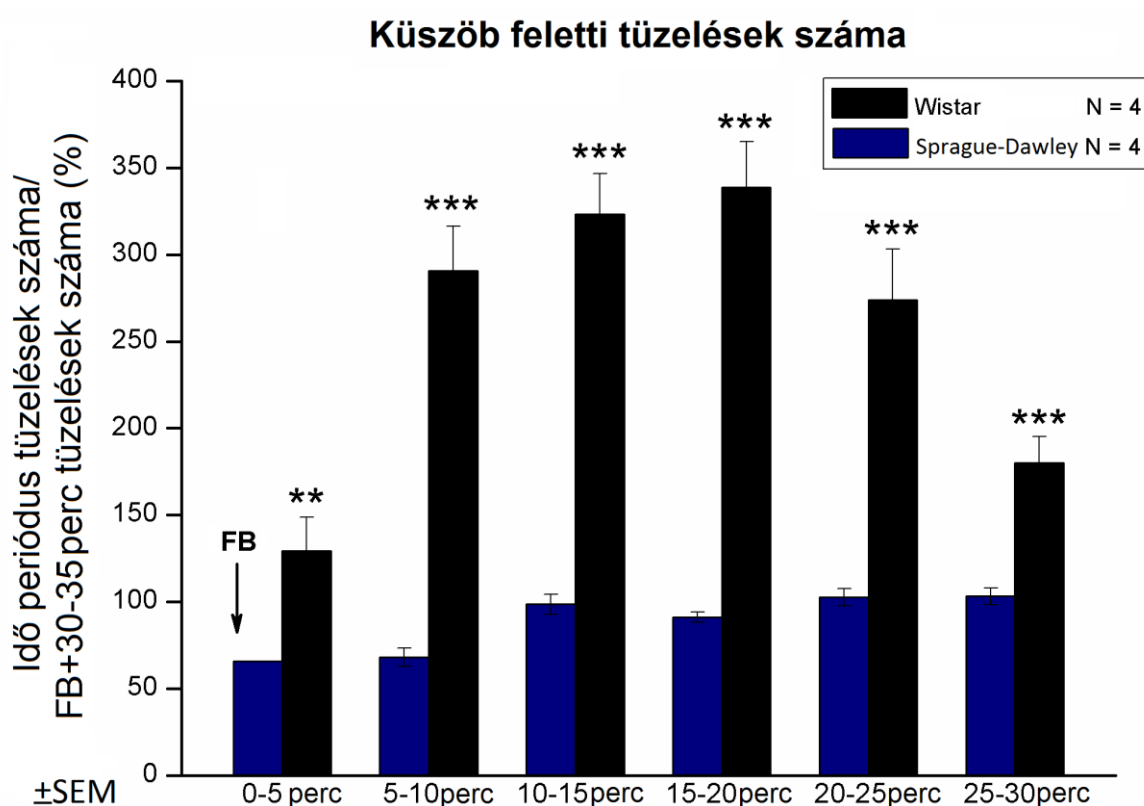
20. ábra: A Wistar (W) és az SD állatok ECoG-jának FB utáni első 20 másodperce a két Charles River patkányvonalban. (Fuzik és mtsai., 2012 nyomán módosítva)

a kérgi aktivitás folytonossága, zavartalansága tekintetében (19. ábra). További különbség figyelhető meg a két patkányvonal globális agyi ischaemia utáni kérgi aktivitásában az FB megjelenésekor látható tüzelési mintázatban is. A Wistar patkányok esetében az első tüzelést 4-5 db újabb tüzelés követi az FB utáni első 20 másodpercben, amelyek egyenletesen elosztva, 3-5 másodpercenként követik egymást. Az SD patkányok FB utáni

első 20 másodpercében átlagosan 4-8 másodperces iktális periódusokra emlékeztető, szakaszokból álló sűrű tüzelés figyelhető meg. Ezeket a szakaszokat kérgi aktivitástól mentes, a sűrűn tüzelő szakaszok hosszánál rövidebb izoelektromos epizódok választják el egymástól (20. ábra).

4.1.2 Küszöb feletti kérgi aktivitás számszerűsítése

Minden állat esetében az összes csatorna adatait elemeztük, melynek eredményeként készült az az oszlopdiagram, amely csoportonként 16 csatorna 5 perces szakaszonként összegzett tüzelésszámát ábrázolja (21. ábra). Az eredmények jól mutatják azt, hogy a



21. ábra: A Wistar és az SD állatok FB utáni 0-30 percének küszöb feszültséget átlépő ECoG tüskéinek számszerűsített adatai az FB utáni 30-35 percre normalizálva. ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$ a két csoport eredményei közötti különbség szignifikancia szintjeit jelölik. (Fuzik és mtsai., 2012 nyomán módosítva)

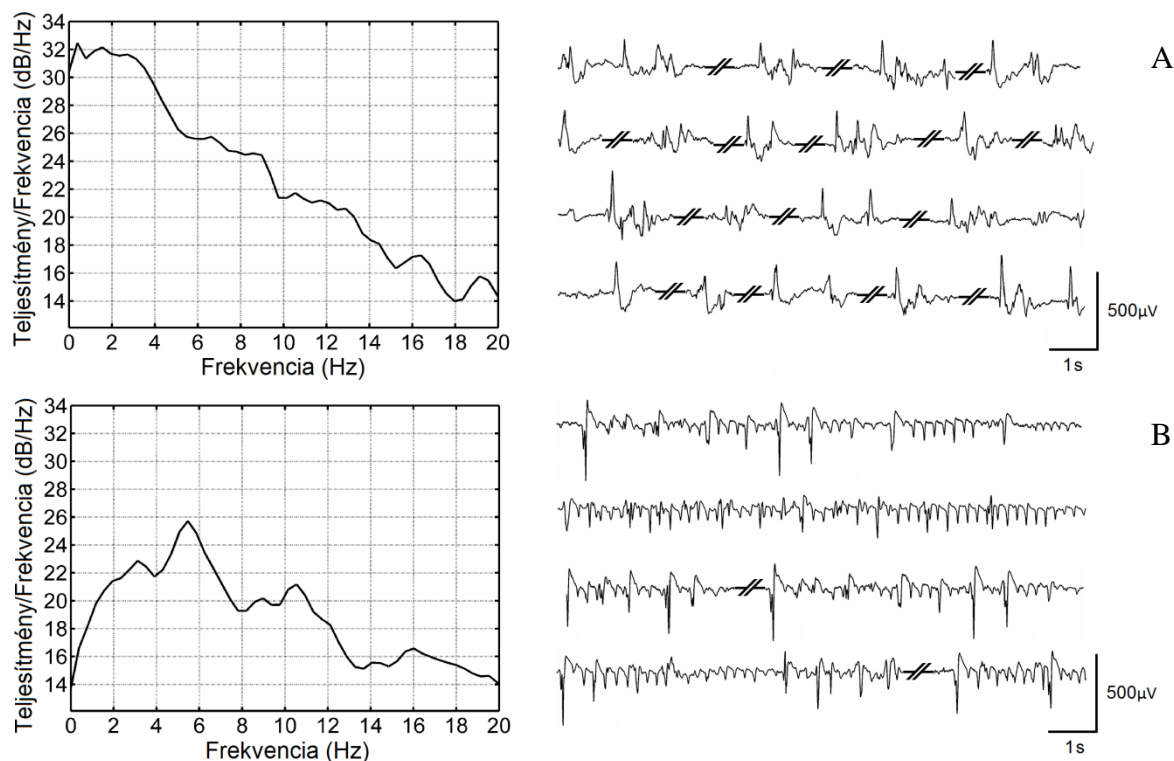
Wistar patkányok ECoG-ja a poszt-ischaemikus periódusban jelentősen nagyobb ECoG-spike számértéket mutat. Az FB utáni 15-20 perc 5 perces szakaszában közel 340 %-os, FB utáni 30-35 perc adataira normalizált ECoG tüskeszámot kaptunk. A poszt-ischaemikus burst periódus FB utáni 5-25 perce közötti szakaszon a Wistar állatok BSR diagramja követi az ECoG ugyanezen ideje alatt látható tüzeléseinek megnövekedett amplitúdóit. A feszültségszűz feletti kérgi tevékenység számszerűsítését ábrázoló diagramon az FB

utáni 5. és 25. perc között 5 percenként meghatározott tüzelési szám is ugyanezt a tendenciát mutatja. Az SD állatok küszöb feletti tüzelésszáma jóval alacsonyabb, csak az FB utáni 30. percre éri el az FB utáni 30-35 perc közötti tüzelésszámot, értéke az ezt megelőző 5 perces periódusokban mindvégig alacsonyab marad. Megfigyelhető az is, hogy az FB utáni 10-15 percig tartó időintervallumban körülbelül 10 %-al magasabb értéket látunk, mint az utána következő, FB utáni 15-20 percig tartó időszakaszban. Ennek oka az, hogy az FB az SD patkányok ECoG-ján a 10 perces globális ischaemia kezdete után néhány tíz másodperccel jelenik meg, vagyis a kétoldali CCA okklúzió megszüntetése épp az FB utáni 10-15 perces időszakaszba esik. Az analízis során az atraumatikus ércsipeszek eltávolításával bevitt mérési zajt tartalmazó ECoG szakaszt kihagytuk az elemzésből, így a látott tüzelésszám-növekedés a nyaki verőerek véráram újraindulásának, és az ebből adódó nagyagykérgi elektromos aktivitásnövekedésnek tudható be.

4.1.3 A frekvencia komponensek teljesítmény-spektruma

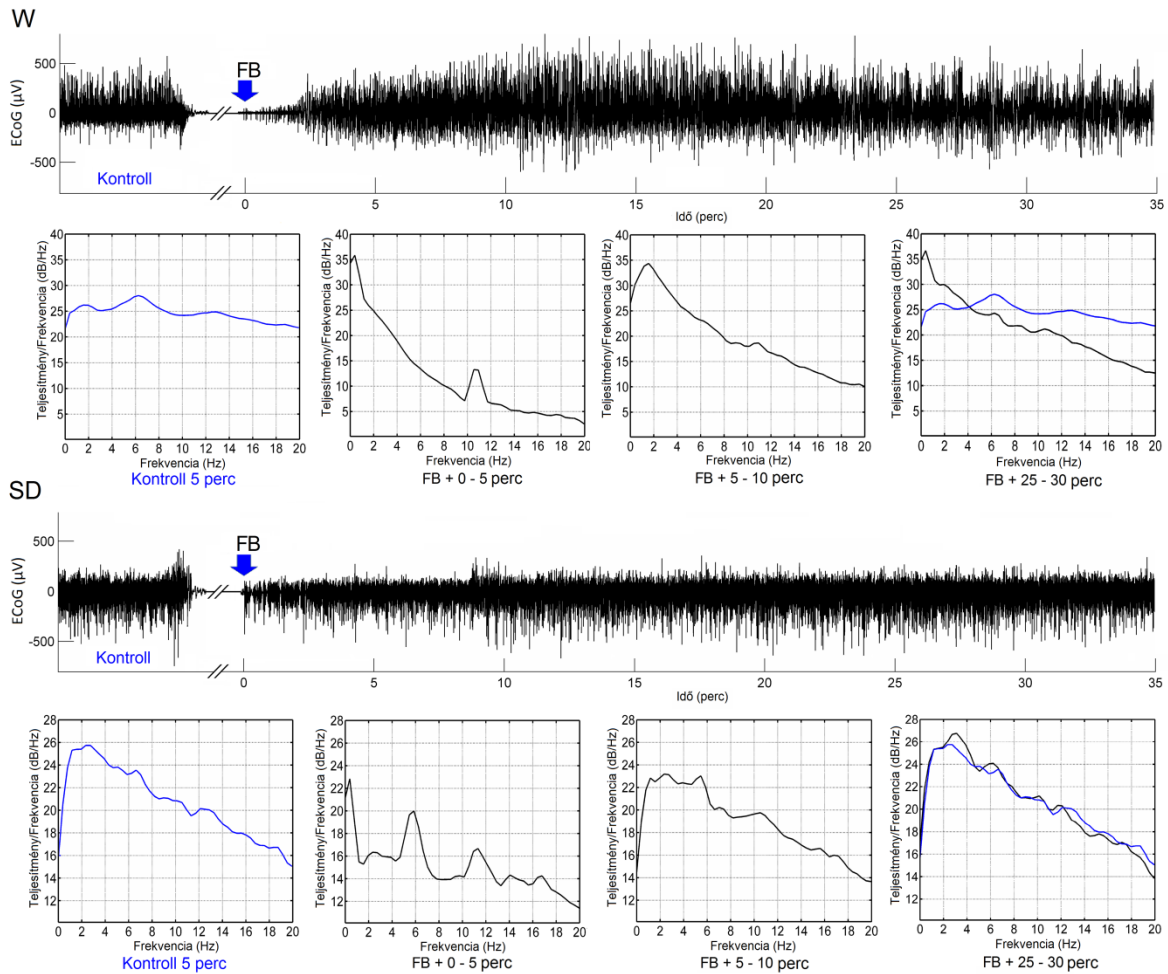
Az eltérő mintázatú FB utáni tüzeléseket, amelyek valószínűleg a két patkányvonal központi idegrendszeri vérellátásának különbségeiből adódtak, az ECoG frekvencia-összetételének elemzésével hasonlítottuk össze. A regisztrált ECoG adatokat az idő dimenzióból frekvencia dimenzióba alakítottuk át, és az egyes frekvenciákra eső spektrális teljesítményt Welch metódussal elkészített periodogramon ábrázoltuk (22. ábra). A frekvencia-analízis nagyobb pontossága érdekében kivágtuk a Wistar és az SD patkányok ECoG adataiból az FB-t követő első perc tüzeléseit. Wistar patkányokban ezek rövidebb, míg az SD állatok esetében jóval hosszabb, 4-6 másodperces tüzeléssorozatok voltak. Ezzel a módszerrel a két patkányvonal FB utáni egy percének átlagos tüzelési frekvenciáját határoztuk meg. A Wistar patkányok periodogramján a 2-4 Hz közötti delta frekvenciák teljesítmény spektruma másfélszeres értéket mutat az SD állatok periodogramján ugyanehhez a frekvencia tartományhoz tartozó értékekhez képest. A 2 Hz alatti delta spektrum összevetésekor azt láthatjuk, hogy a Wistar állatoknál az SD csoport 2 Hz alatti teljesítmény spektrumához képest kétszer akkora értékeket mutat a periodogram. Nagyobb időintervallumot kitöltő ECoG szakaszok frekvenciaelemzésekor a 2 Hz alatti tartomány a regisztrálás folyamatosságából, és így az arteficiális zajok bekerülésének lehetőségéből adódóan kevésbé konzekvens, de a 2 Hz alatti frekvenciasáv ebben az analízisben, ahol az alapvonal hullámozása ki van zárva, valós különbséget mutat. Két frekvenciacsúcs is megfigyelhető az SD patkányok adataiból származó periodogramon, 5,5 Hz-nél és 11 Hz-

nél. Ugyanezeknél a frekvenciáknál a Wistar állatok periodogramján szinte megegyező értékek láthatók, viszont a két frekvenciacsúcs között, és a 10,5 Hz-es csúcs után, a magasabb frekvenciáknál magasabb értékeket olvashatunk le a Wistar patkányok tüzelési frekvenciáit elemző periodogramról. A két patkányvonal jellemző ECoG hullámainak tipikus frekvencia-összetételét megvizsgáltuk a 10 perces 4VO kezdete után, az FB



22. ábra: A Wistar és a SD patkányok tranziens globális ischaemiát követő, az FB után megjelenő tipikus hullámformáinak, tüzeléssorozatainak frekvenciaelemzésének eredményei, a frekvenciák és a rájuk eső dB/Hz-ben megadott spektrális teljesítmény függvényében ábrázolva. Mindkét állattörzs FB-t követő tüzeléssorozatainak Welch periodogramjait bemutatjuk, A: Wistar B: SD. (Fuzik és mtsai., 2012 nyomán módosítva)

megjelenésétől számított minden 5 perc első 1 percében (23. ábra). Megfigyeléseink szerint a Wistar patkányok periodogramjain tipikusan megjelent az FB után 0-5 percig tartó szakaszon egy frekvenciacsúcs 11 Hz-nél, amely szinte minden esetben megtalálható volt ebben a periódusban. Az FB utáni 25-30 percig tartó szakaszon eredményként kapott periodogramot összevetettük a 10 perc 4VO kezdete előtti kontroll szakaszon kapott periodogrammal. Itt a két teljesítmény spektrum nem fedte egymást, vagyis az ischaemiás inzultus hatása, a frekvencia-komponensek arányának eltolódása nem állt helyre az FB utáni 30 percen belül a Wistar állatok esetében. Ezzel szemben az SD patkányok periodogramjait végigkövetve, az FB utáni 30. percben azt láthatjuk, hogy a kontroll szakasz 1 percének Welch periodogramja szinte megegyezik az FB utáni 25-30 perc közötti ECoG teljesítmény spektrumával, vagyis a 4VO beavatkozás ellenére a



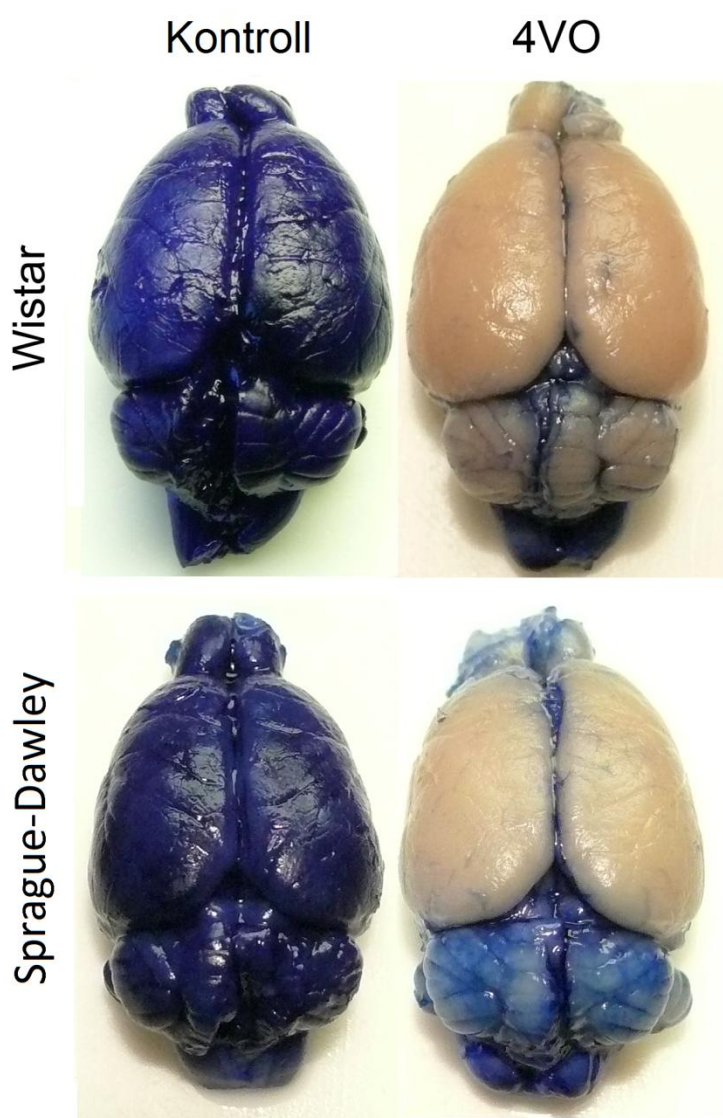
23. ábra: A Wistar és az SD patkánytörzsek ECoG-jának frekvenciaelemzése a kontroll szakasz 1 percén, és az FB utáni első 5 perc első percében, FB utáni 5-10 és FB utáni 25-30 percrenek első perceiben. Az eredményeket Welch periodogramon ábrázoltuk a frekvencia és a rájuk eső teljesítmény-spektrum dB/Hz-ben kifejezett értékének függvényében. A Wistar patkányok egy reprezentatív ECoG regisztrátuma a szomatoszenzoros kéregről az ábra felső részén látható, 5 perc kontrollal, és az FB utáni 35 perces szakasszal, alatta a fent említett időintervallumokhoz készített Welch periodogramok találhatók (W). Az SD állatok egy reprezentatív, szomatoszenzoros kéregről elvezetett ECoG-ja alul látható, alatta az ugyanazokra az FB-hez viszonyított időintervallumokra elkészített Welch periodogramok találhatók (SD). (Fuzik és mtsai., 2012 nyomán módosítva)

teljesítmény spektrum eltolódása az FB utáni 30. percre visszaáll a kontrolléhoz hasonló értékekre. Emellett megfigyelhető az FB utáni 0-5 percben kapott periodogramon két frekvencia csúcs is, amelyek 5,5 Hz-nél és 11 Hz-nél jelennek meg, hasonló módon a 25. ábrán látottakhoz.

4.1.4 Hisztológiai eredmények

A Wistar és Sprague-Dawley állatok agya intakt állapotban és permanens 4VO után

Makroszkópiusan is jól látható, hogy az intakt Wistar és SD patkány törzsek agyában transzkardiális Evans Blue festés után egyaránt erős jelölődés figyelhető meg. Ez a



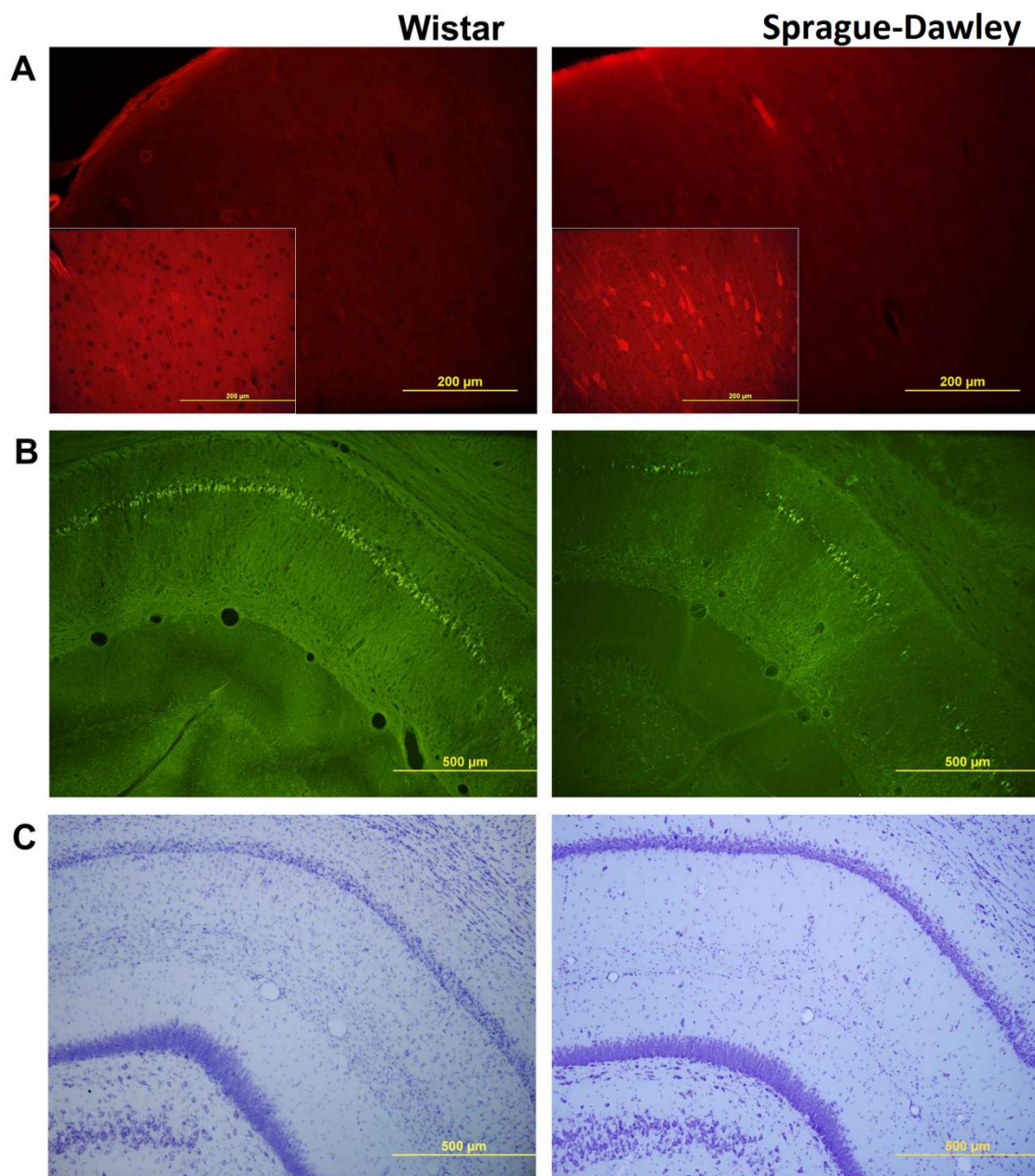
homogén jelölődés a cerebellumban, a cerebrumban, a bulbus olfactoricusban, valamint a gerincvelő rövid megmaradt szakaszában egyformán erőteljes. A permanens 4VO beavatkozást elszenvedett Wistar állatok agyán jól kivehető a különbség az intakt állatok agyának festődéséhez képest. A cerebellumban tapasztaltunk némi festődést, amely gyenge, de egyenletes jelölődést okozott. A cerebrum és a bulbus olfactoricus, a 4VO-nak köszönhetően, kimaradt a fluoreszcens festékekkel történő perfúzióból, így jelöletlenül maradtak ezek a területek. Emellett azt is észre kell venni, hogy sem az Evans Blue előtti foszfát pufferes transzkardiális perfúzióval történő átmosás,

24. ábra: A transzkardiálisan Evans Blue-val perfundált intakt és 4VO beavatkozást elszenvedett Wistar és Sprague-Dawley állatok agyának makroszkópikus képei. (Fuzik és mtsai., 2012 nyomán módosítva)

sem maga a fluoreszcens festékekkel végzett perfundálás nem volt elegendő ahhoz sem, hogy a nagyagykéregből az összes vért maradéktalanul kimossa, ezért maradt meg a kérgi területek rózsaszínes tónusa. Mindebből arra következtethetünk, hogy az említett területen a 4VO alatti nettó perfúzió mértéke a nullához közelített. A transzkardiális perfúzió

sikerességéről tanúskodik a gerincvelő megmaradt részének intakt állatokéval megegyező intenzitású jelölődése. Az SD állatok agyában a permanens 4VO beavatkozást követően jelentősen erőteljesebb Evans Blue jelölődést láthatunk. A cerebellum egységesen és sokkal erősebben festődött permanens 4VO után, mint a Wistar állatokban. Ugyanez mondható el a bulbus olfactoricusról is. A cerebrum esetében egy homogén, de halvány jelölődést láthatunk, vagyis a 4VO állapotában is volt valamilyen mértékű perfúzió a kérgi területeken. A perfúzió sikerességét az SD állatok esetében is jelzi a gerincvelő megmaradt szakaszának erőteljes, kontrolléhoz hasonló intenzitású jelölődése (24. ábra).

A Wistar és Sprague-Dawley állatok hippocampális metszetei



25. ábra: Az Evans Blue-val transzkardiálisan perfundált permanens 4VO-s Wistar és SD állatok fluoreszcens mikroszkópos képei (A). A 4VO műtéten átesett Wistar és SD (SD) állatok 8 napos túlélést követő paraformaldehides fixálás utáni Fluoro Jade C (B), és Cresyl-ibolya (C) festéssel jelölt hippocampális metszetei láthatók, a CA1 régióban. (Fuzik és mtsai., 2012 nyomán módosítva)

A permanens 4VO állapotában Evans Blue-val transzkardiálisan perfundált SD állatok agyából készített metszeteken jól látszik, hogy a homogén fluoreszcens parenchimális háttérből egyértelműen kitűnnek az Evans Blue-val jelölődött sejtek. A Wistar patkányból származó ugyanilyen módon készített minták esetében a szintén meglévő világos fluoreszcens háttéren nem látszanak Evans Blue pozitív sejtek (25. ábra, A panel).

A fluoreszcens Fluoro Jade C festés, amely nagy szelektivitással festi a degenerálódott neuronokat, az SD állatokból származó, 4VO műtétet követő 8 napos túlélés után készült hippocampális metszeteken csak sporadikus jelölődést mutatott. A tranziens globális ischaemiát elszenvedett Wistar patkányok metszetein fluoreszcens mikroszkóp alatt intenzív jelölődést láttunk a hippocampális CA1 régió stratum pyramidale egész hosszában. A gyrus dentatus mindkét vonalban intakt maradt (25. ábra, B panel).

A Cresil-ibolya festés eredményeinél jól látszik, hogy a 10 perc 4VO következményeként az SD törzs metszetei erős festődést mutattak a hippocampus CA1 régiójában. A piramissejtek alakja normális maradt, nyoma sem volt a sejttetek zsugorodásának, vagy magi eredetű kondenzátumok megjelenésének. A Wistar állatoknál azonban a CA1 régióban jelentős sejpusztulás zajlott le, így jóval kevesebb Cresil-ibolya jelölődést láthatunk. Emellett a magi kromatin irreverzibilis kondenzációja is végbement a jelölt sejtek egy részében. Megfigyelhető volt továbbá a Cresil festés által láthatóvá tett reaktív asztrogliózis és a makrofágok infiltrációja a hippocampális CA1 régióban (25. ábra, C panel).

4.2 Az oxálecetsavval és DHEA-val végzett kombinált kezelések

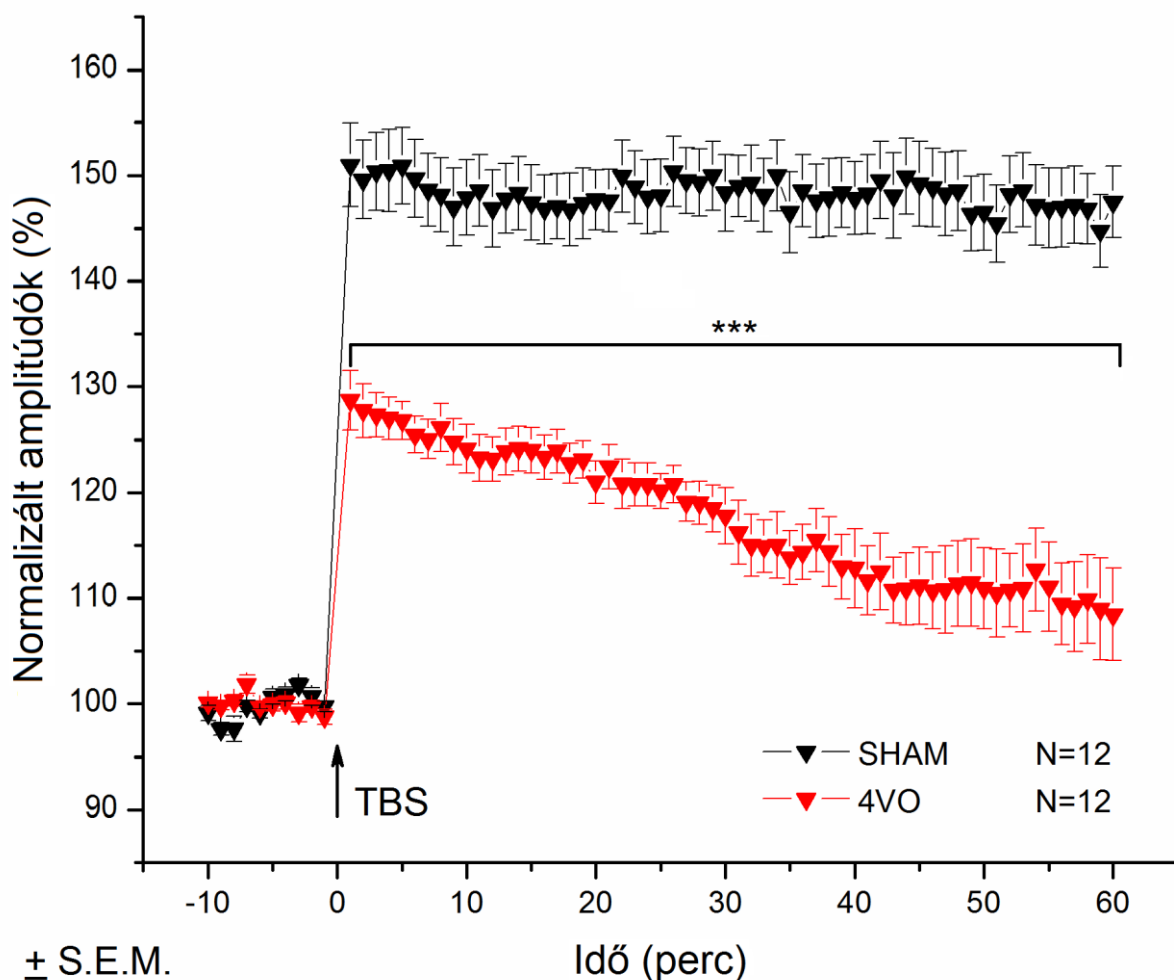
Az oxálecetsav neuroprotektív hatóanyagként történő alkalmazását 4VO ischaemia modellen is teszteltük. Az előző kísérletsorozatban bemutatott eredmények alapján egyértelművé vált az, hogy a 4VO globális ischaemia a rendelkezésünkre álló Charles River patkánytörzsek közül csak a Wistar-al valósítható meg, mert ezekben az állatokban ténylegesen megszüntethető az agyi vérellátás, amely jelentős neuron pusztulást okoz az érintett agyi területeken. Az oxálecetsav neuroprotektívnek bizonyult a korábban részletezett 2VO kísérleteinkben, így ígéretes védőhatást vártunk a globális ischaemiás patkánymodell esetében is. Ismert, hogy ischaemiás inzultus után az agy interstíciumában ugrásszerűen megnövekszik a Glu koncentrációja (Castillo és mtsai., 1996). Fiziológias körülmények között az intersticiális térben Glu mikrodialízis bioszenzorral mérhető $4.2 \pm 1.5 \mu\text{M}$ Glu koncentráció a 10 perces 4VO hatására közel hatvanszorosára, $255.7 \pm 72.8 \mu\text{M}$ -os koncentrációra növekszik (Caragine és mtsai., 1998). Ennek megfelelően a Glu-scavenging kellő hatékonyságához jelentősen nagyobb koncentrációban kell alkalmazni az oxálecetsavat, mint a 2VO kísérletek esetében, ahol a kialakuló excitotoxikus állapot kizárólag szinaptikus plaszticitásbeli csökkenéshez vezetett, míg sejtpusztulás, vagy sejtkárosodás nem történt (Marosi és mtsai., 2009). A megfelelő oxálecetsav koncentráció megkereséséhez kezdetben egy alacsonyabb (kis dózis OxAc: 4 mg/100 g), míg a későbbiekben egy magasabb dózist (nagy dózis OxAc: 20 mg/100 g) alkalmaztunk. A 20 mg/100 g-os mennyiség a kísérleti alkalmazásából kapott eredmények alapján ígéretesnek bizonyult. A neuroprotekción további fokozása érdekében azonban nem az intravénásan beadott oxálecetsav mennyiségét növeltük, hanem egy másik, szintén endogén természetű neuroprotektív anyagot, a DHEA-t vontuk be az általunk alkalmazott neuroprotektív stratégia hatékonyságának növelése érdekében.

4.2.1 *In vitro* elektrofiziológiai eredmények

A Wistar patkányok koronális hippocampális agyszeletein végzett *in vitro* elektrofiziológiai mérésekkel a CA1 régió stratum pyramidale rétegében helyet foglaló piramissejtek apikális dendritjei és a CA3 régió piramissejtjeinek axonjaiból álló Schaffer-kollaterálisok között létrejött szinapszisok plaszticitását vizsgáltuk. A kísérletekben az LTP kiválthatóságát és fenntarthatóságát teszteltük. Az extracelluláris elvezetések során a

fEPSP amplitúdók nagyságának alakulását követtük figyelemmel a TBS-sel történő LTP indukció és LTP fenntartás folyamán, melynek értékeit a 10 perces kontroll szakasz értékeire normalizálva adtuk meg minden esetben.

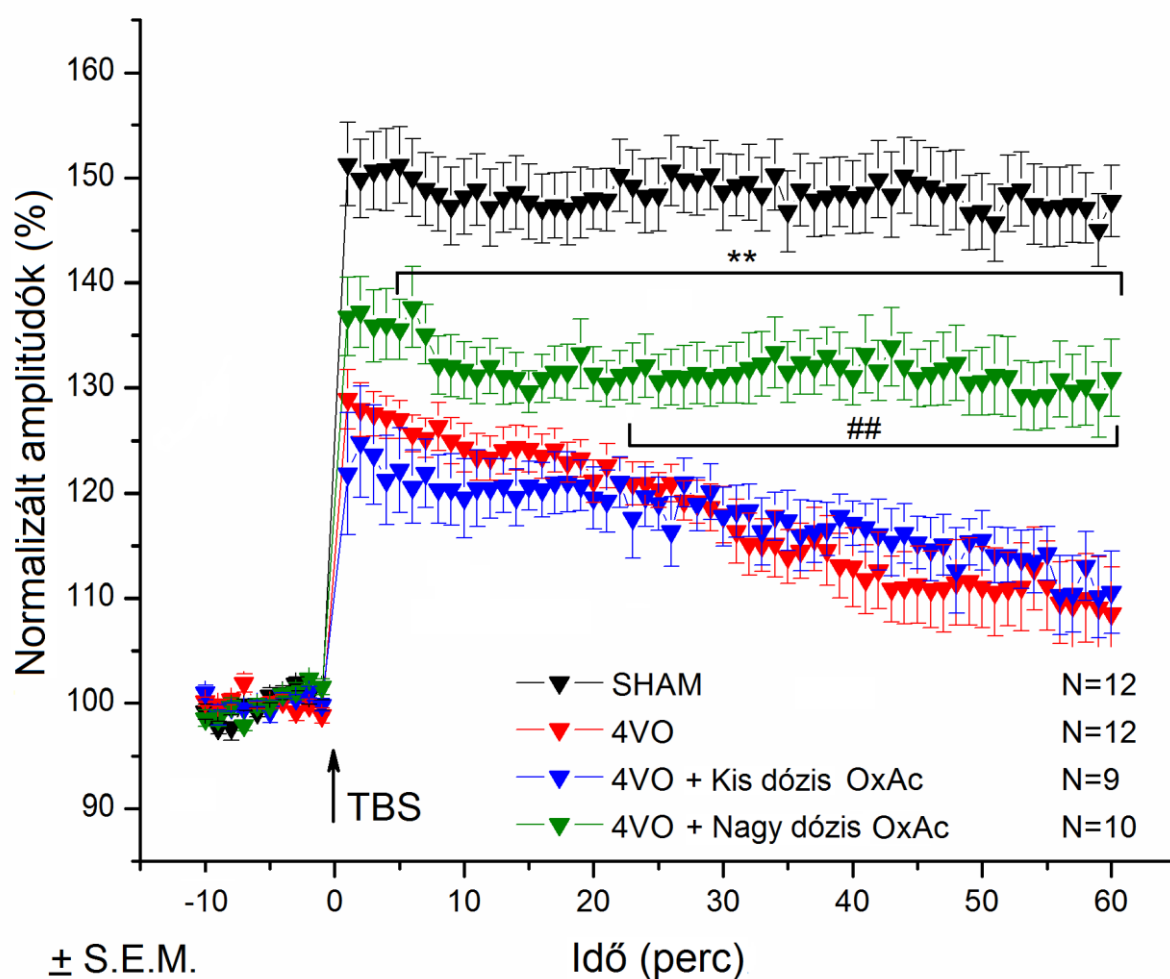
4.2.1.1 A 4VO hatása az LTP kiválthatóságára



26. ábra: 10 perc 4VO globális ischaemiát elszenvedett (4VO), intakt kontroll (SHAM) állatok hippocampális CA1 régiójában kiváltott LTP. A fEPSP amplitúdók értékét S.E.M.-el ábrázoltuk az idő függvényében. *** = $p \leq 0,001$ a negatív kontrollhoz viszonyított szignifikancia szinteket jelölik. (FJ nem publikált megfigyelése)

Az intakt állatok CA1 régiójában kiváltható LTP 150 %-os növekedést mutatott a 10 perces kontroll szakasz fEPSP amplitúdóihoz képest. A TBS ingerlést követő 1 órás regisztrálás során a megnövekedett mezőpotenciál amplitúdók változatlanul 150 % körüli értéken maradtak. A 4VO műtéten átesett, 8 napot túlélő állatok csoportjában az LTP kiválthatóság maximuma 130 % volt. A 60 perces követés során folyamatosan csökkent a fEPSP-k amplitúdója, de az 1 órás regisztrálás végére sem érte el a kontroll szintet. Az LTP indukciót követő első perctől kezdve szignifikáns a kontroll és a 4VO csoport fEPSP amplitúdóbeli különbsége (26. ábra).

4.2.1.2 Az oxálecetsav hatása a 4VO állatok szinaptikus plaszticitására

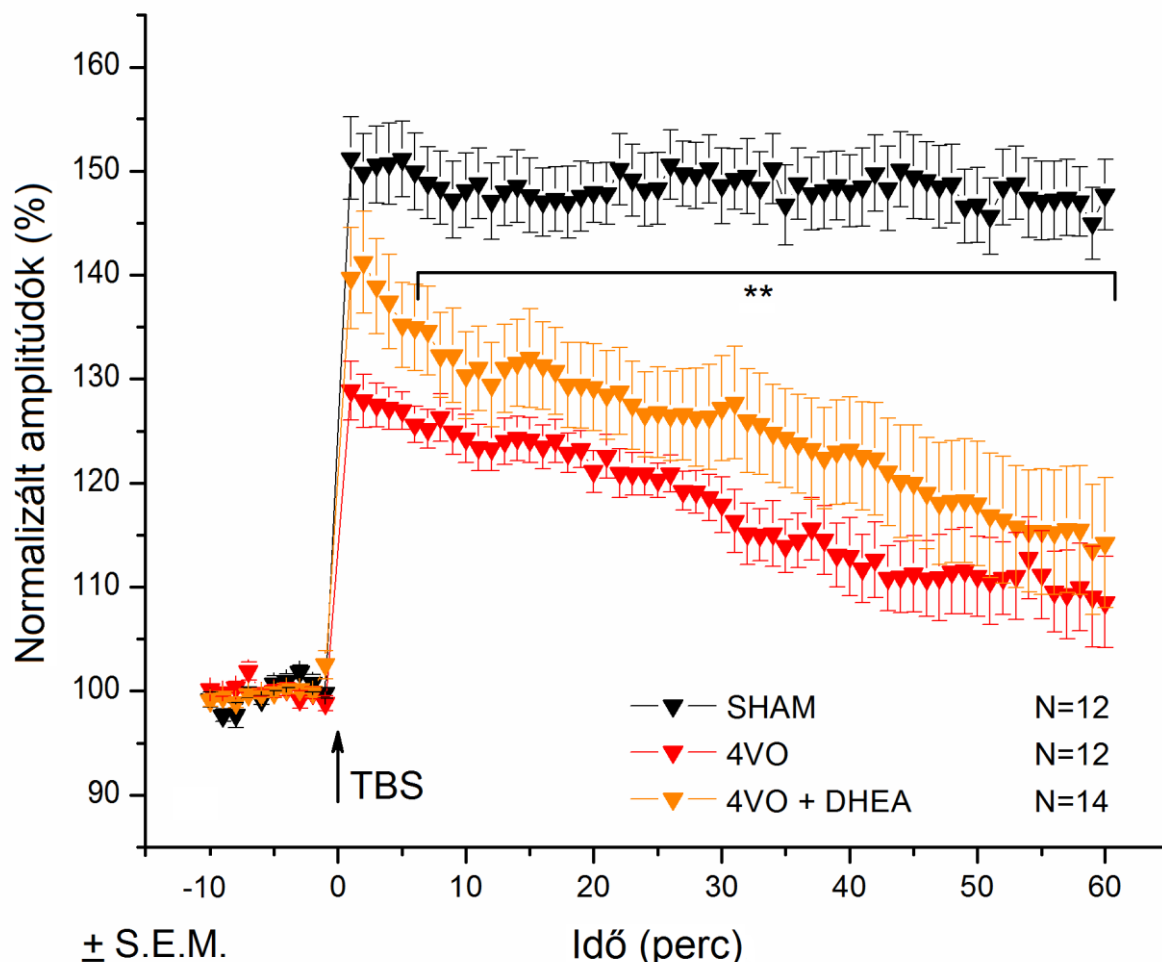


27. ábra: 10 perc 4VO globális ischaemiás (4VO), intakt kontroll (SHAM), kis dózis oxálecetsavval (4VO+Kis dózis OxAc) valamint nagy dózis oxálecetsavval (4VO+Nagy dózis OxAc) kezelt állatok hippocampális CA1 régiójában kiváltott LTP. A fEPSP amplitúdók értékét S.E.M.-el ábrázoltuk az idő függvényében. ** = $p \leq 0,01$; a negatív kontrollhoz viszonyított, és ## = $p \leq 0,01$ a pozitív kontrollhoz viszonyított szignifikancia szinteket jelölik. (FJ nem publikált megfigyelése)

Az oxálecetsav Glu-scavenging hatása az alkalmazott kis, 4 mg/100 g dózisban kevésnek bizonyult ahhoz, hogy javítsa a globális ischaemia okozta funkciókárosodást. A nagy, 20 mg/100 g oxálecetsav intravénás dózisa ezzel szemben jelentős fEPSP amplitúdónövekedést okozott az LTP indukció után. A hosszútávú potencírozódás kiváltása a 4VO+Nagy dózis OxAc csoportnál a TBS utáni első percekben elérte a 135 %-ot, majd az egy órás követés végére sem csökkent le 130 % alá a normalizált mezőpotenciál amplitúdók értéke. A TBS utáni 23. perctől szignifikáns, $p \leq 0,01$ különbség mutatkozott a nagy dózis oxálecetsavval kezelt, 4VO beavatkozást elszenvedett állatcsoport és a pozitív kontroll csoport fEPSP amplitúdó értékei között. Emellett a TBS utáni 60 perces követés 4. perctől kezdve szignifikáns $p \leq 0,01$ különbséget láthatunk a 20

mg/100 g oxálecetsavat kapott állatok és az intakt kontroll állatok fEPSP amplitúdó értékei között (27. ábra).

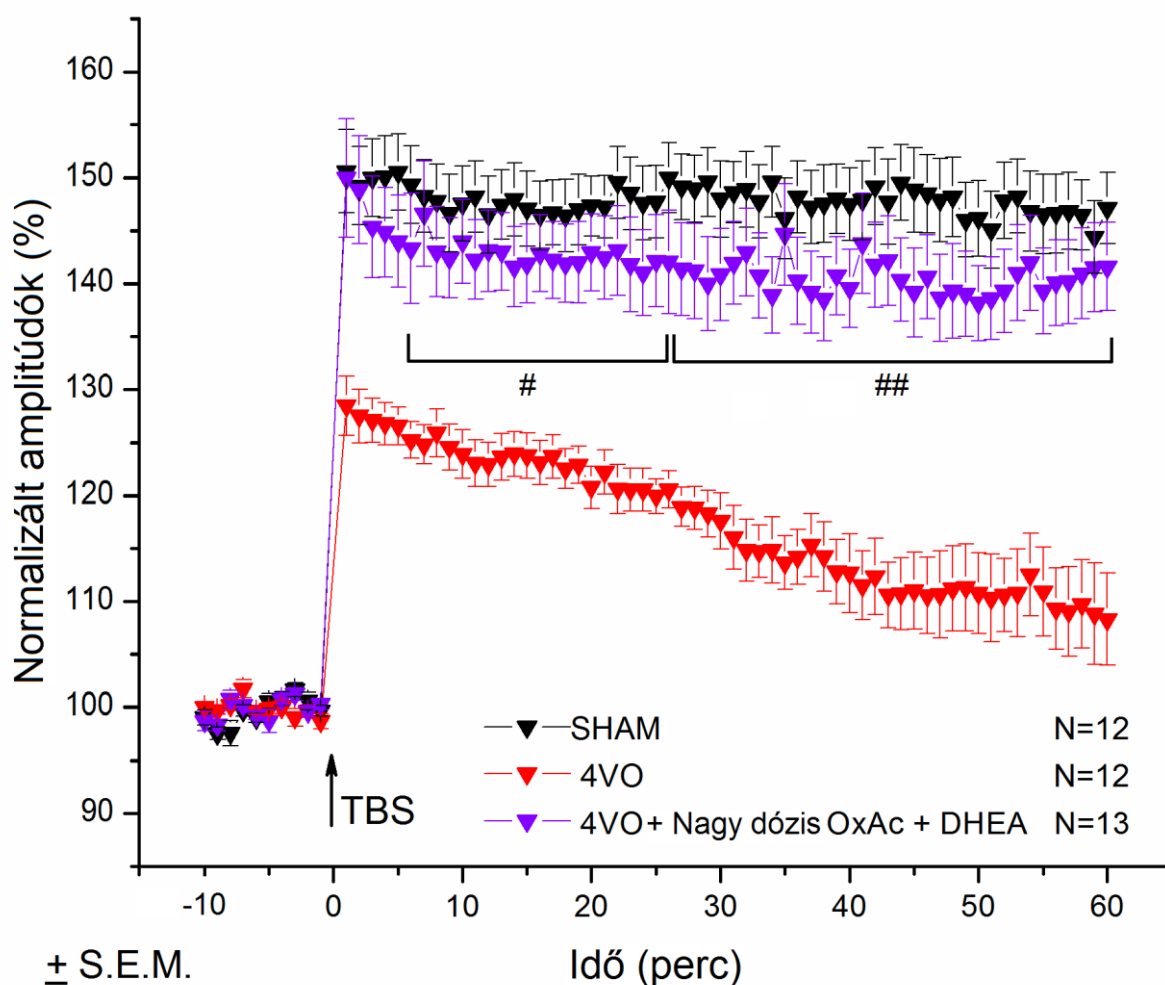
4.2.1.3 A DHEA hatása 4VO állatok szinaptikus plaszticitására



28. ábra: 10 perc 4VO globális ischaemiát elszenvedett (4VO), intakt kontroll (SHAM) és a DHEA-val kezelt állatok hippocampális CA1 régiójában kiváltott LTP. A fEPSP amplitúdók értékét S.E.M.-el ábrázoltuk az idő függvényében. ** = $p \leq 0,01$; a negatív kontrollhoz viszonyított szignifikancia szintet jelöli. (FJ nem publikált megfigyelése)

A 24 órával az ischaemiás inzultus után 2 mg/100 g DHEA kezelést kapott állatcsoport hippocampusában, 8 napot követő túlélés után, a TBS hatására a kezelést nem kapott állatok eredményeihez képest nagyobb potencírozódást láttunk. Ez a különbség a pozitív kontroll eredményeihez viszonyítva azonban nem volt szignifikáns. A theta burst ingerlés utáni percekben a legmagasabb értékű amplitúdónövekedés 140 % volt, de a 60 perces követés teljes ideje alatt lecsökkentek a fEPSP amplitúdók, a 60. percre elérve a 115 %-ot. A neuroprotektív hatás nem volt szignifikáns. A negatív kontrollhoz képest a 6. perctől kezdve szignifikáns $p \leq 0,01$ különbséget láthattunk a DHEA kezelt csoport esetében (28. ábra).

4.2.1.4 Az oxálecetsav és a DHEA kombinált kezelése hatása a 4VO állatok szinaptikus plaszticitására



29. ábra: 10 perc 4VO globális ischaemiás (4VO), intakt kontroll (SHAM) és a kombinált kezelést kapott (4VO + Nagy dózis OxAc+DHEA) állatok hippocampális CA1 régiójában kiváltott LTP. A fEPSP amplitúdók értékét S.E.M.-el ábrázoltuk az idő függvényében. # = $p \leq 0,05$; ## = $p \leq 0,01$ a pozitív kontrollhoz viszonyított szignifikancia szinteket jelölik. (FJ nem publikált megfigyelése)

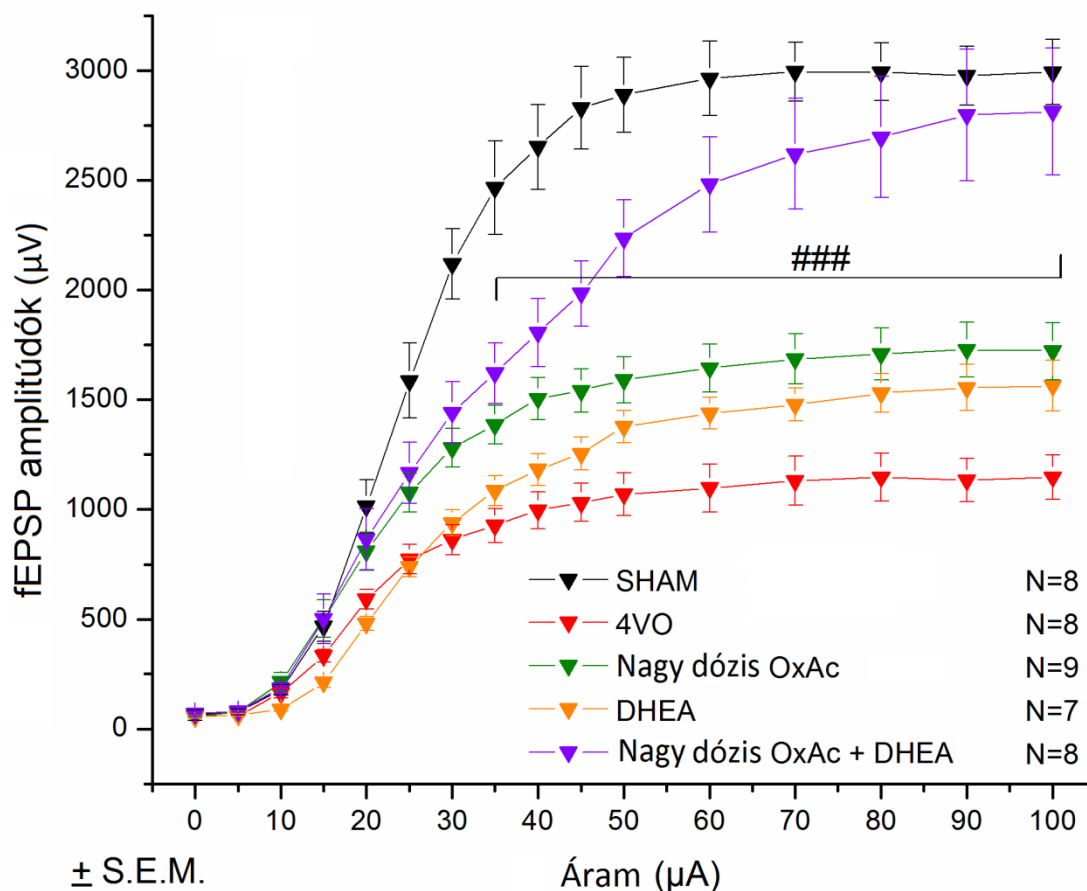
A két endogén természetű anyag, az oxálecetsav és a DHEA együttes alkalmazása az Anyagok és módszerekben leírt időbeli elrendezéssel, látványos funkciómegőrzést okozott a hippocampus CA1 régiójában. Az oxálecetsav neuroprotektív hatását vizsgáló kísérleteinkben a 4 mg/100 g-os dózis nem volt eredményes a globális ischaemia okozta szinaptikus plaszticitáscsökkenésének kivédésében, ezért a jelentősen nagyobb LTP kiválthatóságot eredményező 20 mg/100 g oxálecetsav dózist alkalmaztuk a kombinált kezelés során. A 10 perces 4VO után 24 órával adott 2 mg/100 g DHEA dózis, együtt alkalmazva a reperfúzió kezdetekor adott 20 mg/100 g oxálecetsavval, képes volt a 4VO hatására bekövetkező szinaptikus plaszticitáscsökkenést kivédeni. A kombinált kezelést

kapott csoport TBS utáni fEPSP amplitúdó értékei a követés első perceiben 150 %-ra emelkedtek, majd a 60 perces követés hátra levő részében 139 - 146 %-os értékek között maradtak. A statisztikai analízis eredményei szerint a kombinált kezelést kapott csoport LTP kiváltás utáni fEPSP amplitúdói nem különböznek szignifikánsan az intakt kontroll csoport eredményeitől. A 10 perc 4VO-s pozitív kontroll csoport fEPSP amplitúdó értékei és a kombinált kezelést kapott állatcsoport LTP indukció utáni mezőpotenciál amplitúdói között szignifikáns különbség mutatkozott. Ez a különbség a 60 perces TBS utáni regisztráció 6. percétől a 28. percéig $p \leq 0,01$ szignifikancia szintet, a 29. percétől a 60. percéig pedig már $p \leq 0,001$ szignifikancia szintet mutatott. A két endogén természetű anyaggal adott kombinált kezelés tehát sikeresnek bizonyult a tranziens globális ischaemia okozta szinaptikus plaszticitáscsökkenés kivédésében a hippocampus CA1 régió piramissejtek apikális dendritjei és a Schaffer-kollaterálisok axonterminálisai közötti szinapszisokban (29. ábra).

4.2.1.5 Az I/O görbék

Az alapvető glutamáterg transzmisszió vizsgálatára I/O görbét készítettünk. A szinaptikus tulajdonságok ilyenfajta vizsgálatával azt akartuk kideríteni, hogy a kísérletesen előidézett 10 perces 4VO milyen mértékben károsította a Schaffer-kollaterálisok és a hippocampus CA1 piramissejtek közötti alapvető szinaptikus transzmissziót. Az I/O görbék regisztrálásakor az egyre növekvő ingerlő áramokra válaszként kapott fEPSP amplitúdók értékét követtük figyelemmel. Az ingerlő áramlépcső 5 μ A-enként haladt 0-50 μ A között, 50-100 μ A között pedig 10 μ A-enként. A 10 perces 4VO globális ischaemiát elszenvedett csoportnál jelentősen alacsonyabb fEPSP amplitúdó értékeket kaptunk a SHAM csoport eredményeihez képest. Már a 20 μ A-es ingerlésnél fele akkora mezőpotenciál amplitúdókat mérhettünk a 4VO csoport esetében, az I/O görbe későbbi szakaszán ez a különbség csak egyre növekedett. Ebből tehát azt a következtetést vonhattuk le, hogy a CA1-es régió alapvető szinaptikus funkcióit erőteljesen érintette a 4VO beavatkozás. A DHEA csoport esetében látszott neuroprotektív hatás, ahogyan a Nagy dózis OxAC csoportnál is, és itt valamivel nagyobb fEPSP amplitúdókat mérhettünk, mint a DHEA kezelt csoportban. A két kezelés önmagában azonban nem adott szignifikáns különbséget a pozitív kontrollhoz képest. A hippocampális hálózat komplexitásának csökkenése, amely a szinaptikus kapcsolatok károsodásából adódott, jelentősen kisebb

mértékű volt a 20 mg/100 g oxálecetsav és 2 mg/ 100 g DHEA kezelést kombináltan kapott csoportban. Az I/O görbék regisztrálásakor az ingerlés 35 μ A felett adott



30. ábra: Az álműtött (SHAM), a 10 perc globális ischaemiát elszenvedett (4VO), a DHEA kezelt (DHEA), a nagy (20 mg/100 g) dózisú oxálecetáttal kezelt (Nagy dózis OxAc) és a kombinált kezelést (Nagy dózis OxAc + DHEA) kapott állatok I/O görbéi a fEPSP értékek és az ingerlő áramok nagyságának függvényében. ### = $p \leq 0,001$ a pozitív kontrollhoz viszonyított szignifikancia szinteket jelölik. (FJ nem publikált megfigyelése)

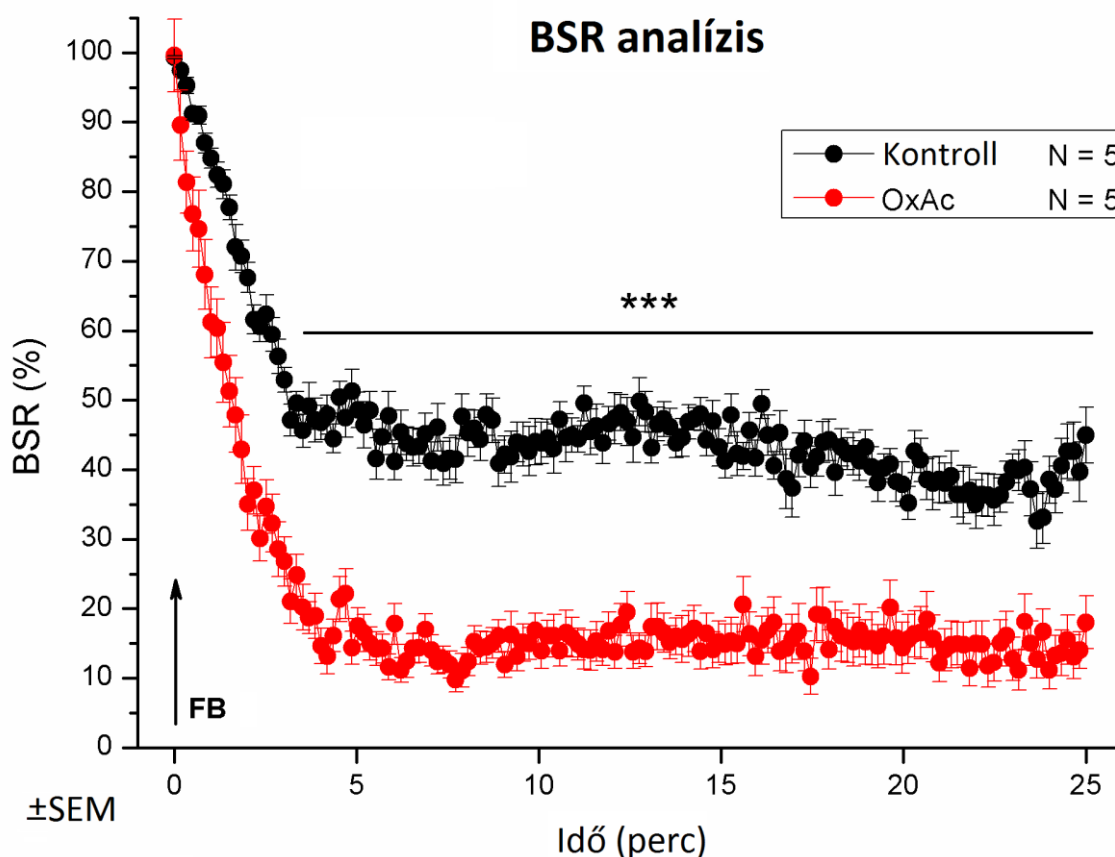
szignifikáns $p \leq 0,001$ különbséget a fEPSP amplitúdók nagyságában a 4VO beavatkozást elszenvedett pozitív kontroll és a két endogén természetű anyaggal kombináltan kezelt csoport között (30. ábra).

4.2.2 In vivo elektrofiziológiai eredmények

In vivo elektrofiziológiai kísérleteinkben nyomonkövettük a 4VO műtéten átesett kezeletlen (Kontroll), és az oxálecetsav kezelést kapott (OxAc) állatok BSR%-ának, küszöb feletti kérgi tevékenység számszerű értékének és az ECoG frekvenciaösszetevőinek Glu-scavenging hatására történő változását.

4.2.2.1 BSR analízis

Lefuttattuk a BSR analízist a kontroll és a 20mg/100 g oxálecetsavat kapott csoportok ECoG-ján az FB-t követő 25 perces perióduson.



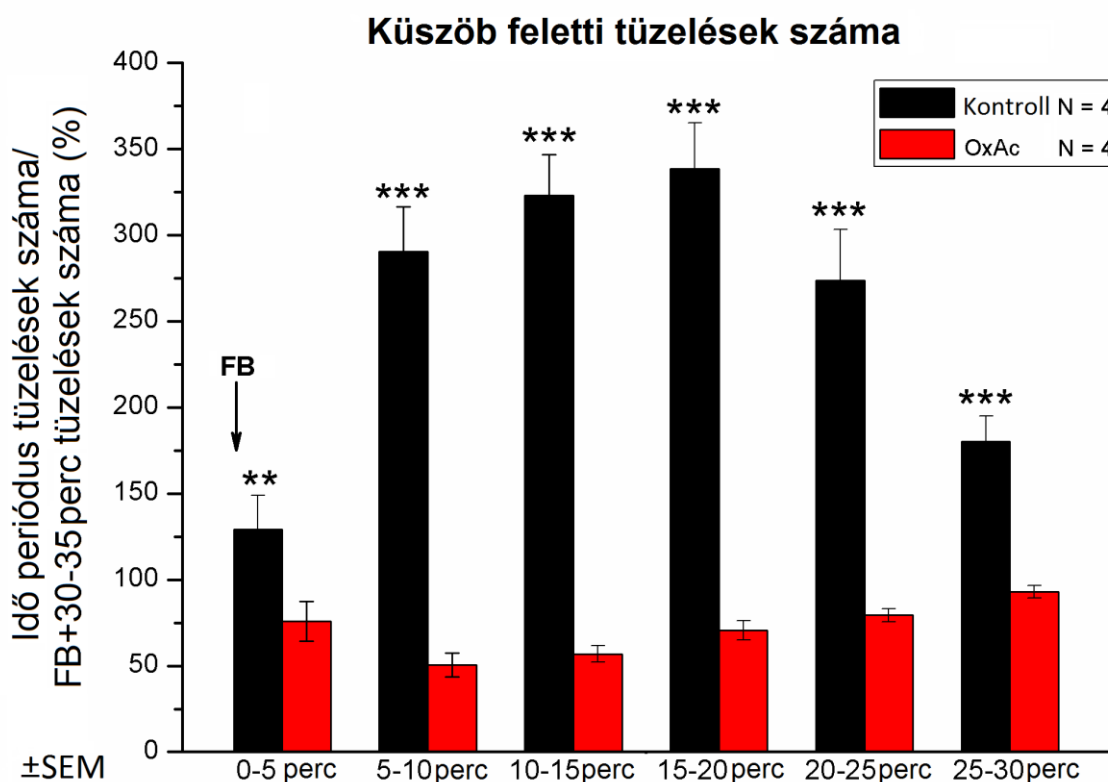
31. ábra: BSR analízis. A Kontroll és a 20 mg/100 g oxálcetát kezelést kapott (OxAc) állatok BSR% értékeit az idő függvényében ábrázoltuk az FB pillanatától kezdve. Minden állat esetében négy csatorna átlagából tevődtek össze az adatok. *** = $p \leq 0,001$ a neaktív kontrollhoz viszonyított szignifikancia szinteket jelölik. (FJ nem publikált megfigyelése)

A kontroll csoport esetében a BSR% értéke 45-50 %-os volt az FB utáni első percekben, a 25. FB utáni percben pedig 35-45 %-os értéket vett fel. A BSR% a oxálecetsavval kezelt

csoport esetében 15 %-ra esett le az FB utáni 4. percben, és nem változott a reperfúzió további szakaszában sem, vagyis az FB utáni 25. percben is 15 % körüli értéket adott. Az oxálecetsavval kezelt csoport eredményei szignifikánsa $p \leq 0,001$ különbséget mutattak a kezeletlen, pozitív kontroll csoport BSR% értékeihez képest az FB utáni 4. perctől (31. ábra).

4.2.2.2 Küszöb feletti kérgi aktivitás számszerűsítése

Meghatároztuk a kérgi események számát a kezeletlen kontroll és az oxálecetsavval kezelt csoportok FB utáni 30 percében. Ha a fél órás időintervallum egészen határozzuk meg a küszöböt átlépő események számát, akkor azt láthatjuk, hogy a kezeletlen



32. ábra: Az oxálecetsavval (OxAc) kezelt és kontroll állatok FB utáni 0-30 percének küszöb feszültséget átlépő ECoG tüskéinek számszerűsített adatai az FB utáni 30-35 percre normalizálva. ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$ a két csoport eredményei közötti különbség szignifikancia szintjeit jelölik. (FJ nem publikált megfigyelése)

pozitív kontroll állatokban a 10 perc 4VO-t követő 30 perces szakaszon a tüzelésszám jelentősen alacsonyabb, mint az oxálecetsavval kezelt állatok esetében. Részletesebb elemzés gyanánt meghatároztuk a feszültségszűzöböt átlépő események számát az FB utáni 5 perces szakaszokon, és a kapott értékeket az FB utáni 30-35. perc szakaszán kapott tüzelésszám értékére normalizáltuk. A eredmények azt mutatták, hogy a 20 mg/100 g

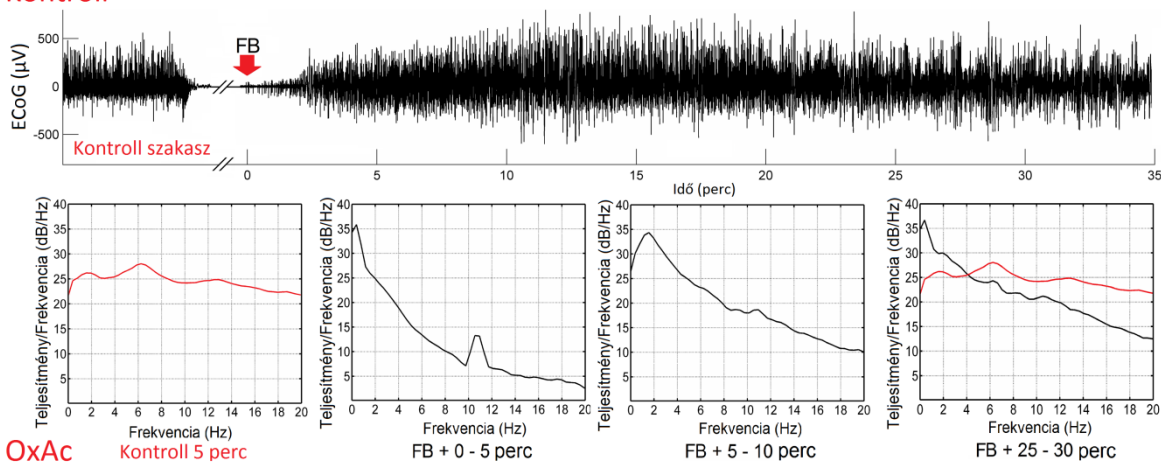
oxálecetsavas kezelés, amelyet a kétoldali CCA leszorítás után intravénásan adtunk, már az FB utáni 0-5 perc közötti időszakaszban szignifikáns $p \leq 0,01$ különbséget eredményezett a feszültségküszöb feletti tüzelésszám értékeiben. Az FB utáni 5. perctől az FB utáni 20. percig tartó periódusban alacsonyabb tüzelésszámot kaptunk, mint az FB utáni 0-5 perc közötti szakaszon, azonban itt már $p \leq 0,001$ szignifikanciájú különbség volt a kontroll és az oxálecetsav kezelt csoport eredményei között. A Glu-scavenging során tehát olyan mértékű Glu koncentráció csökkenés történhetett az agy intersticiális terében, amely lecsökkentette a kontroll állatok esetében már látott poszt-ischaemikus burst periódusra jellemző feszültségküszöb feletti tüzelésszámot. Az oxálecetsav kezelt csoportban az ECoG tüskék száma az FB utáni 5. perctől kezdve folyamatosan emelkedett, de még az FB utáni 30. percre sem érte el az FB utáni 30-35. perc közötti értéket, ahol még mindig $p \leq 0,001$ szignifikanciájú különbség mutatkozott a kontroll és az oxálecetsav kezelt patkányok eredményei között (32. ábra).

4.2.2.3 Frekvencia-komponensek teljesítmény spektruma

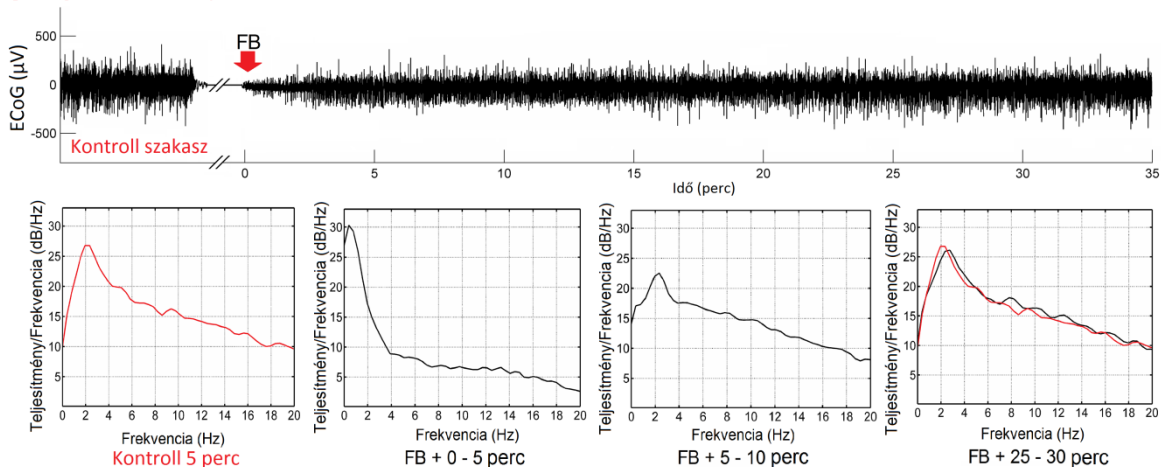
A két csoport, azaz, a kontroll és az oxálecetsav kezelést kapott állatok jellemző ECoG hullámainak tipikus frekvencia összetételét megvizsgáltuk a 10 perces 4VO után, az FB megjelenésétől számított minden 5 perces időszakasz első 1 percében (33. ábra). A kontroll állatok FB utáni 0-5 perc közötti periodogramján szinte minden állat esetében feltűnt egy teljesítménycsúcs, amely a 11 Hz-es frekvencia értékhez tartozott. Ez a csúcs egy esetben sem volt látható az oxálecetsavas kezelést kapott állatok ugyanezen időszakasz periodogramján. Az FB utáni 25-30 percig tartó szakasz teljesítmény-görbéjét összevetettük a kontroll szakaszon kapott periodogrammal. Itt jól látható, hogy a két teljesítmény spektrum nem fedi egymást, vagyis a frekvencia-komponensek teljesítmény spektrumának ischaemiás inzultus hatására való eltolódása nem állt helyre az FB utáni 30 percen belül a kontroll állatok esetében. Az oxálecetsavval kezelt állatok esetében, ezzel szemben azt a tendenciát mutatták, hogy az FB utáni 25-30 percig tartó szakaszon kapott Welch periodogram görbéje átfed a kontroll szakasz 5 perces intervallumára kapott teljesítmény-görbével. Ezek alapján feltételezhetjük azt, hogy a Glu-scavenging sikerességéből adódóan a Glu excitotoxikus hatása által fellépő intracelluláris Ca^{2+} koncentráció növekedése, és ezzel a kerge neuronhálózat irreguláris tüzelése kisebb mértékben alakul ki. Mindez a teljesítmény-görbéken jól látható, a kontroll szakaszhoz képest jelentkező különbségek pedig rövidebb idő alatt tűnnek el. Az *in vivo* kísérletek

eredményei jól kiegészítik az *in vitro* elektrofiziológiai eredményeket. A globális ischaemia után közvetlenül végzett oxálecetsavval történő Glu-scavenging képes volt az ischaemia szinaptikus plaszticitáscsökkenést előidéző folyamatait gátolni.

Kontroll



OxAc



33. ábra: A 10 perc 4VO-n átesett kontroll (Kontroll) és a 10 perc 4VO-n átesett, majd oxálecetsav kezelést kapott (OxAc) állatok ECoG-jának frekvenciaelemzése a kontroll szakasz 1 percén, az FB utáni első 5 perc első percében, az FB utáni 5-10 és FB utáni 25-30 percének első perceiben. Az eredményeket Welch periodogramon ábrázoltuk a frekvencia és az azokra eső teljesítmény spektrum dB/Hz-ben kifejezett értékének függvényében. Az ábra felső részén látható a kontroll állatok egy reprezentatív ECoG regisztrátuma a szomatosenzoros kéregről, 5 perc kontroll szakasszal, és az FB utáni 35 perces szakasszal, alatta pedig a fent említett időintervallumokról készített Welch periodogramok találhatók (Kontroll). Az OxAc állatok egy reprezentatív, szomatosenzoros kéregről elvezetett ECoG-ját mutatjuk be az ábra alsó részén, 5 perc kontroll és az FB utáni 35 perces szakasszal, legalul pedig az ugyanazokra az FB-hez viszonyított időintervallumokra elkészített Welch periodogramok (OxAc). (FJ nem publikált megfigyelése)

5. Diskusszió

Kísérleteink céljával kezdetben azt tűztük ki, hogy az oxálecetsavas kezeléssel megvalósítható neuroprotekciónak hatékonyságát 4VO globális ischaemia modellen vizsgáljuk meg. A 4VO modell kivitelezésekor azonban, nem várt módon, markáns különbségeket fedeztünk fel a Wistar és az SD patkánytörzsek között. Bármely neuroprotektív stratégia tesztelésére csak olyan modell alkalmas, ahol stabilan és megismételhető módon előidézhető jelentős mértékű sejtpusztulás és szinaptikus plaszticitáscsökkenés megy végbe. Kezdeti megfigyeléseink során azt állapítottuk meg, hogy a két patkánytörzsben eltérő mértékű sejtpusztulás zajlott le a 10 perces globális ischaemiát követően.

Korábbi nyoma is van az irodalomban annak, hogy az agyi vérellátás (CBF, cerebral blood flow) csak ~15 %-ra csökken az SD állatok esetében a minden részletében Pulsinelli 1979-es cikke alapján kivitelezett 4VO műtét során. Az agyi véráram teljes leállításához Caragine 11VO műtétet hajtott végre (1998). A beavatkozás annyiban tért el a Pulsinelli metódustól, hogy az arteria bazilaris disztális szakaszát, az arteria pterygopalatinust, az arteria thyroidea superiort és az arteria occipitalisokat elektrokauterizálták, és elvágták. Ennek a műtéti eljárásnak köszönhetően a CBF 5 %-ra esett vissza, és az extracelluláris Glu csúcs is alacsonyabb volt (Caragine és mtsai., 1998). A hosszabb ideig, percekig is fennálló vérellátáshiány megnöveli az extracelluláris tér Glu koncentrációját, és az NMDA receptor aktiváció pedig excitotoxicitást okoz, valamint fokozott intracelluláris Ca^{2+} koncentráció növekedést (Dirnagl és mtsai., 2003). Korábbi tanulmányok megerősítették azt, hogy a citoszolban tartósan megnövekedett Ca^{2+} koncentráció kiemelkedő szerepet játszik a szinaptikus plaszticitás károsodásában és a sejtpusztulás kialakulásában (Lipton, 1999; Hou és mtsai., 2002; Brostrom és mtsai., 2003). Az ischaemiás inzultus utáni reperfüzió során egy második Ca^{2+} koncentráció növekedés történik, amely a későbbi apoptotikus folyamatokért felelős (Siesjo és mtsai., 1999). A CBF mennyisége tehát alapvetően meghatározza az ischaemiás állapotból adódó károsodás mértékét. A lecsökkent áramlású ischaemiás periódusban alacsony az oxigén ellátottság és szabadgyökök keletkezhetnek, amelyek befolyásolják az idegsejtekből történő serkentő aminosav felszabadulást, ez pedig visszahat a szabadgyökök képződésének folyamataira (Pellegrini-Giampietro és mtsai., 1990). Így tehát ha a Wistar és az SD patkánytörzsek között különbségek mutatkoznak a 4VO ischaemiás periódus alatti CBF-ben, akkor ez magyarázatul szolgálhat az általunk tapasztalt különbségekre.

A 4VO modell Wistar és SD patkánytörzseken való alkalmazhatóságának felmérésére elektrofiziológiai és hisztológiai kísérleteket végeztünk (Fuzik és mtsai., 2012). *In vivo* ECoG méréseink eredményeinek elemzésekor megvizsgáltuk a BSR%-ot, a poszt-ischaemiás periódus ideje alatt tapasztalható megnövekedett ECoG tükesszám értékét, és az ischaemiás inzultus előtti és utáni időperiódusok ECoG-jának frekvenciaösszetételét.

A BSR analízis (Rampil és mtsai., 1992), amely egy a kérgi aktivitás folyamatos *in vivo* monitorozására kialakított módszer, lehetőséget ad a megfelelő off-line adatfeldolgozásra is. A BSR analíziséhez szükséges feszültségküszöb megválasztásához Vijn és Sneyd módszerét alkalmaztuk (1998). Így lehetségessé vált a poszt-ischaemiás ECoG mintázat vizsgálata, amely csendes, izoelektromos, és aktívan tüzelő szakaszok alternáló megjelenéséből áll (Pulsinelli és mtsai., 1979; Geocadin és mtsai., 2002; Moldovan és mtsai., 2004; Koenig és mtsai., 2006). A BSR analízisben az SD állatok esetében a BSR% értéke már a 10 perc 4VO ideje alatt lecsökkent 15 %-ra, majd a reperfúzió kezdetétől 25 percen át szinte egyenletesen 0 % volt. A Wistar patkányokban 40-50 %-os érték elérése után az FB-t követő 25. percben is 40 % körüli volt a BSR%. Valószínűsíthető az, hogy ezek a különbségek összefüggésbe hozhatók az ATP anyagcsere és az idegszövet perfundáltságának különbségeivel a két patkánytörzsből. Az ischaemia és reperfúzió során, az oxigénhiányos állapotból adódóan, az energiaszükségletek fedezését biztosítandó rohamosan nő az intracelluláris ATP lebontás. A lebontásból származó adenosin agyi extracelluláris terekben való koncentrációnövekedését Wistar patkányon végzett *in vivo* mérések eredményeként Van Wylen és csoportja már 1986-ban leírta (Van Wylen és mtsai., 1986). Az így felszabadult adenosin A1-adenosin receptoron keresztül gátolja a szinaptikus jeltovábbítást *in vitro* és *in vivo* (Gervitz és mtsai., 2001; Gervitz és mtsai., 2003). Az 1,3-dipropil-8-ciklopentilxantin (DPCPX), egy A1-adenosin receptor antagonist, amelynek *in vivo* i.p. beadásával csökkenteni tudták a BSR% értékét, vagyis mérsékelni lehetett az A1 receptoron keresztül megvalósuló szinaptikus gátlást a mérésekhez felhasznált Wistar patkányok nagyagykérgén (Ilie és mtsai., 2009). A nagy mennyiségű adenosin hatására ATP-szenzitív K⁺-csatornák is kinyílnak, amelyek így szintén gátolhatják a túlzott depolarizációt, vagyis neuroprotektívek (Heurteaux és mtsai., 1995; Dirnagl és mtsai., 2003). A poszt-ischaemikus periódus tipikus szakaszos aktivitása tehát adódhat az oxigénhiány miatt fellépő magas extracelluláris adenosin koncentráció szinaptikus működést gátló hatásából. A 4VO-s SD állatokban az agyi véráramlás nem szűnik meg teljesen, ennek következtében az adenosin koncentrációja az extracelluláris térben feltehetően nem nő meg olyan mértékben, mint a Wistar patkányok esetében.

A poszt-ischaemiás kérgi aktivitás ECoG tüskeszáma is jelentősen eltért a két patkánytörzsben. A Wistar patkányoknál, a kontroll szakasz tüzelésszámának akár háromszorosát is meghaladó aktivitás volt tapasztalható az ischaemiás inzultus után. Az SD állatoknál az ischaemiás periódus kisebb behatással volt a kérgi működés fokozódására. A különbség adódhat a globális ischaemia okozta excitotoxikus állapot eltérő mértékéből a két patkánytörzsben. A 4VO alatt a nagyagykérgi CBF 15 %-ra csökken az SD patkányokban, és bár ez nagyobb extracelluláris Glu csúcsot okoz, mint a 11VO elvégzése után mérhető jóval kisebb, 5 %-os CBF (Caragine és mtsai., 1998), a későbbi apoptotikus folyamatokért az ischaemiás inzultus utáni reperfúzió során bekövetkező második Ca^{2+} koncentrációnövekedés a felelős (Siesjo és mtsai., 1999). A folyamatos, 15 %-os vérellátásból adódóan az SD állatok esetében nem beszélhetünk a szó szoros értelmében vett reperfúzióról. Az SD patkányokban a 4VO során az ECoG folyamatos kérgi aktivitást mutat, amely ugyan kisebb ECoG tüske amplitúdóval, de a globális ischaemia teljes ideje alatt folyamatosan mérhető (Fuzik és mtsai., 2012).

A nagyagykéreg III., V. és VI. rétegének idegsejtjei extrém módon érzékenyek az ischaemiás inzultusokra, ebből adódóan az oxigénhiányos állapotban az EEG illetve az ECoG hullámmintázatai is megváltoznak (Jordan, 2004). A fiziológiás állapot fenntartásához szükséges szöveti perfúzió lecsökkenésekor a kérgi aktivitás magasabb frekvencia komponensei esnek ki először, vagyis ezek spektrális teljesítménye csökken le a leghamarabb. Az alacsonyabb frekvenciák spektrális teljesítménye csak a vérellátás hozamának jelentős lecsökkenésével gyengül meg (Foreman és mtsai., 2012). A Wistar és az SD állatok primer szomatoszenzoros kérgéről és primer motoros kérgéről elvezetett ECoG frekvenciaelemzése is azt mutatta, hogy mind a két törzsben csökkentek a magas frekvenciák teljesítmény-spektrumai a 10 perces 4VO hatására. Az SD állatok esetében az FB utáni 30. perc és az ischaemiás periódus előtti szakasz periodogramjainak görbéi szinte fedték egymást, vagyis a feltehetően alacsonyabb véráramlás-kiesés kisebb káros behatással volt a nagyagykérgi neuronhálózat működésére. Mindez csak közvetett bizonyíték, feltételezésünk közvetlen bizonyítására, esetünkben a CBF mérése adott volna lehetőséget, ami nem állt módunkban. A kollaterálisok és anasztomózisok számát és elhelyezkedését illetően, patkánytörzsek közötti és törzseken belüli vaszkuláris anatómiai különbségeket is kimutattak már korábban (Oloff és mtsai., 1997). A nagyagykérgi területek perfundáltságában tehát különbözik a két patkánytörzs, ezt saját makroszkópikus hisztológiai vizsgálataink is igazolták. Emellett hisztológiai eredményeinkben a kisebb mértékű hippocampális sejtpusztulást is igazoltuk az SD patkányok esetében, amely

szintén a globális ischaemia során megmutatkozó, keringésbeli különbségeknek tudható be. Szintén törzsek közötti és törzseken belüli különbségeket írtak le az ischaemia utáni infarktus kiterjedésében (Oloff és mtsai., 1995a; Oloff és mtsai., 1995b), a hippocampus CA1 régiójában 2VO előagyi ischaemia után mérhető kiváltott válaszok amplitúdójában (Marosi és mtsai., 2006), valamint az MK-801 vonalanként változó neuroprotektív hatásában (Oloff és mtsai., 1996) is. Ezeken a megfigyeléseken kívül azonban ismert azt is, hogy az agyi vaszkularizáció anatómiai különbségeinek megléte mellett, a különböző törzsek kollaterális keringésének luminális felszíne megközelítőleg azonos nagyságú (Brown, 1966; Oloff és mtsai., 1997). Oloff és munkatársai azt a következtetést vonták le, hogy a mikrovaszkuláris eltérések mellett az ischaemiára adott szöveti válasz is eltér a törzsek között, és a két jelenség együtteséből adódik az ischaemiás lézió kiterjedésében tapasztalt különbség (Oloff és mtsai., 1997).

Az Evans Blue nagy affinitással kötődik a szérum albumin fehérjéihez (Wolman és mtsai., 1981). Az agyi ischaemia a vér-agy-gát sérülésével jár együtt, (Dobbin és mtsai., 1989), ennek következtében a szérumfehérjék, így az albumin is, kijut a vérpályából, és az idegsejtek az extracelluláris térből azt felveszik. Fluoreszcens mikroszkópos vizsgálattal a neuronokban lévő Evans Blue-val jelölt albumin nyomunkövesztő (Sasaki és mtsai., 1976; Rakos és mtsai., 2007). A makroszkópikus hisztológiai eredményeink arra mutattak rá, hogy az SD patkányok nagyagykérgében már nem detektálható, kimosódott vér, és a kéregben található Evans Blue jelölődött idegsejtek jelenléte a nagyobb mértékű 4VO alatt megmaradó CBF-nek köszönhető. A globális ischaemia során is fennmaradó lassú véráramlást, Caragine és csoportja "slow flow"-ként írta le SD állatokban (1998). A Wistar patkányok kérgi területein nem mosódott ki teljesen a kapillárisokban rekedt vér, valamint Evans Blue sem jutott a nagyagykéregbe, így fluoreszcens Evans Blue jelölődést sem tapasztaltunk a kérgi idegsejtekben. Nem tudjuk felmérni azt, hogy vajon a Wistar patkányoknál a vér-agy-gát az alacsonyabb vérellátás, vagyis a „slow flow” hiányából adódóan nagyobb károsodást szenvedett-e, mint az SD patkányok esetében, mert a permanens 4VO elrendezésében nem juthatott vér a nagyagykérgi kapillárisokba. A 10 perces 4VO-t követő 8 napos túlélés után is végeztünk, hisztológiai vizsgálatokat, amelyek jelentős piramissejt pusztulást mutattak ki a Wistar patkányok hippocampális CA1 régiójában, amely az agy ischaemiára egyik legérzékenyebb területe (Schmidt-Kastner és mtsai., 1991; Sas és mtsai., 2008; Gellert és mtsai., 2011). Az SD állatok hippocampális metszetein ugyanakkor nagyon kis mértékű, szórványos sejtpusztulást tapasztaltunk, vagyis csekélyebb volt az ischaemiás állapot okozta károsodás. Eddigi eredményeink

összegzéséből tehát arra a következtetésre jutottunk, hogy a további 4VO kísérleteinkben a Wistar törzset alkalmazzuk, mert bennük a 10 perc globális ischaemia megismételhető és jelentős mértékű sejtpusztulást idéz elő.

Az ischaemia súlyosságától függően a folyamatnak számos végkimenetele lehetséges (Farkas és mtsai., 2007), egészen a csak fiziológiailag mérhető plaszticitáscsökkenéstől (Marosi és mtsai., 2009) a hippocampális sejtpusztulásig, ahogyan azt a 4VO globális ischaemiánál is láthatjuk (Gellert és mtsai., 2011). Az agyi ischaemia által előidézett állapot milyensége szoros összefüggésben áll az agyszövet Glu szintjének növekedésével (Davalos és mtsai., 2000). Ez arra engedett következtetni, hogy a Glu koncentrációjának emelkedése okozza az ischemiás körülmények kedvezőtlen kimenetelét (Gottlieb és mtsai., 2003). A két ismert Glu-scavenger, a piruvát és az oxálecetsav közül 4VO kísérleteink során az utóbbit vizsgáltuk, ugyanis korábbi kutatások is előjelezték, hogy a piruvátnál hatékonyabbnak minősül az oxálecetsav az agyi Glu koncentráció csökkentésében (Gottlieb és mtsai., 2003). Zlotnik és munkatársainak kulcsfontosságú megfigyelése volt az, hogy az oxálecetsav plaszticitást növelő hatása elmaradt akkor, ha az intravénásan adagolt oxálecetsav mellett azonos koncentrációjú Glu is beadásra került a kísérleti állatokba, illetve, hogy az oxálecetsav beadása 1 mmol/100 g mennyiségben 40 %-os Glu koncentráció csökkenést eredményez a vérben (2007). Ehhez kapcsolódó agyi mikrodialízis kísérletek is bizonyítják az oxálecetsav hatásosságát a Glu koncentráció csökkentését illetően (Teichberg és mtsai., 2009).

A neurotranszmittert fogadó receptorok stabilitása és működése mellett a neurotranszmitter mennyiségére, és az erre ható transzportokra is érdemes figyelmet fordítani a neuroprotektív stratégiák kialakítása során. A bevezetésben már említett oxálecetsav kiváltotta szívóerő, amely a Glu-t az agy extracelluláris teréből a vérpályába juttatja, Glu-transzporterek segítségével valósul meg. A vér-agy-gát endothel sejtei közti zonula occludens-ek (tight junction) a legtöbb molekula számára átjárhatatlanok. Főleg azok jutnak át, amelyek lipid-oldékonyak, vagy saját transzportutakkal rendelkeznek. A vér-agy-gáton keresztüli Glu transzportot először Oldendorf W. és Szabó J. írták le (1976). A továbbiakban koncentráció gradiens ellenében történő, energia befektetést igénylő aktív Glu transzportot is mérték (Drewes és mtsai., 1977a). Valamivel később már pontosan elkülöníthetővé vált a kutatók számára az a három transzporter típus, amelynek később humán analógjait is felfedezték. Ez a három típus a GLAST, a GLT-1, patkány vaszkuláris elemeiből izolált transzporterek, és az EAAC1 volt, amelyet nyúl agyszövetéből izoláltak. Humán analógjai genetikailag 95 %-ban megegyeznek az előbbiekkal. Az EAAT1 a

GLAST megfelelője, az EAAT2 a GLT-1 megfelelője, az EAAT3 pedig az EAAC1-el mutat legtöbb hasonlóságot (O'Kane és mtsai., 1999). Ezeket a transzportereket molekuláris biológiai módszerekkel határozták meg, majd az expressziójukat követték nyomon. Így ma már tudjuk, hogy az asztrocitákon található az EAAT1 és EAAT2, a neuronokon pedig az EAAT3. Az EAAT transzporterek megtalálhatók a kapillárisok endothel sejtjein is. A kapilláris endothel sejtek membránpotenciálja fiziológias állapotban stabil, és ischaemiás állapotban is az marad (Nicholls és mtsai., 1990). Különböző kinetikai vizsgálatok során fény derült arra is, hogy a három transzporter, az EAAT1, EAAT2 és az EAAT3 egymáshoz viszonyított aktivitási aránya 1:3:6, ezt a transzporterek egyenkénti blokkolásával állapították meg. Emellett fény derült a transzporterek Na^+ -érzékenységére, ugyanis Na^+ ion hiányában 50-70 %-al csökkent a fehérjék aktivitása. Az még nem tisztázott, hogy a Glu transzportja során kettő, vagy három Na^+ ion kíséri egy Glu-t (O'Kane és mtsai., 1999). Ezek a transzporterek biztosítják tehát a vér-agy gát abluminális felszínén történő Na^+ -függő aktív Glu-transzportot, ezt eközben segíti egy facilitatív transzportfolyamat a luminális oldalon, amely a Glu-t a vérbe juttathatja. Az asztrocitákon lévő transzporterek a sejt intracelluláris terébe juttatják a Glu-t, ott glutaminná alakítják, és ezt követően az visszakerül az extracelluláris térbe. Ha a Glu-többség a neuronokba kerül, akkor ott képes raktározódni, és a későbbiekben a sejt felhasználja a szinaptikus jelátvitelhez. Ha az endothelben halmozódik fel a Glu, akkor a Glu beáramlás mellett, a sejtekben glutamin Glu-vá alakulása zajlik le, ezáltal a Glu koncentrációja magasabb lesz az intracelluláris térben, mint a vérplazmában, és facilitatív módon kerül át a vérbe. Ischaemia vagy hypoxia esetén depolarizálódnak a neuronok, és az asztrociták, ennek hatására a rajtuk elhelyezkedő transzporterek „fordítva” kezdenek működni, vagyis tovább növelik az agy extracelluláris terének Glu koncentrációját (Nicholls és mtsai., 1990; Szatkowski és mtsai., 1990). Ezzel szemben a kapilláris endothel sejtjeinek stabil marad a membránpotenciálja az ischaemia ideje alatt, így a rajtuk található EAAT transzporterek működése nem változik meg (Teichberg és mtsai., 2009). A hipoperfúzió során a kapillárisok endothel sejtjei és az asztrocita végtalpak a legkevésbé érintettek, mert viszonylag kis szubsztrát igényük van. Az asztrocita sejtestek és a neuronok teljesítményéhez, anyagcseréjéhez szabott kiemelkedő cukor, valamint oxigén igény miatt az ischaemiás körülmények következtében csak a legnagyobb cukor és oxigén igényű területeken fordul meg a transzport iránya. (O'Kane és mtsai., 1999). Így csak az endothel sejtek található transzporterek azok, amelyek normál működésre képesek ischaemiás körülmények között, és csökkenthetik az agy megemelkedett Glu szintjét

(Teichberg és mtsai., 2009). Rendeltetés szerinti működésük esetén tehát (Oldendorf és mtsai., 1976; Drewes és mtsai., 1977b; Gottlieb és mtsai., 2003) ezek a transzporterek az agyból a vérbe történő Glu transzport közvetítésével képesek megvédeni az agyszövetet az excitotoxicitástól, ezzel csökkentve a sérülés súlyosságát. Az agyból a vérbe történő Glu áramlás fokozása a Glu scavenging módszer alapja (Gottlieb és mtsai., 2003). Az ischaemiás modell alkalmazásakor figyelembe kell venni az oxálecetsavas kezelés viszonylag szűk időablakát is, amely patkányok esetében legfeljebb két óra az oxigénhiányos állapot után (Gottlieb és mtsai., 2003; Zlotnik és mtsai., 2007). Ez alatt az időperiódus alatt marad megemelkedett szinten a Glu a traumás agyi sérülések után (Faden és mtsai., 1989; Guyot és mtsai., 2001). Ezzel szemben humán terápiás vonatkozásban a traumás sérülés utáni magas Glu szint akár több napon át is mérhető (Baker és mtsai., 1993; Bullock és mtsai., 1998; Vespa és mtsai., 1998).

A Glu-scavenging módszerét alkalmaztuk a globális ischaemiás 4VO modellen is, és arra voltunk kíváncsiak, hogy képes-e a módszer olyan mértékben lecsökkenteni az extracelluláris tér Glu koncentrációját, amely megóvjaa a hippocampus és a kéreg sejtjeit az excitotoxicitástól. Az eredmények tárgyalásánál bemutattuk, hogy az oxálecetsav képes növelni az LTP kiválthatóságát 4VO után. A szív-megállást mimikáló 4VO ischaemiás modell kivitelezése során nagy mennyiségű Glu szabadul fel. A 10 perc 4VO globális ischaemiát követően a kérgi és hippocampális Glu koncentráció az inzultust megelőző 1-10 μmol -ról 150 μmol -ra változik (Asai és mtsai., 1996). Kísérleteinkkel közvetetten igazoltuk, hogy az oxálecetsav megnövelte és felgyorsította a hippocampus extracelluláris teréből történő Glu kiáramlást a vérbe, a vérben működő Glu-scavenger aktivitásának köszönhetően. Elképzelhető ugyanakkor az is, hogy valamilyen oxálecetsav által kiváltott korrekció történt a neuronok energiaháztartásában is, az ischaemia okozta mitokondriális funkciócsökkenést kiküszöbölendő. Az oxálecetsav részt vesz a glükoneogenezis, a citromsav- és az urea-ciklus körfolyamataiban és az aminosav anyagcserében is. Az ATP szintézishez elengedhetetlen a jelenléte, és folyamatos utánpótlása is az, mert nélküle a citromsav-ciklus és ezzel együtt a terminális oxidáció elektrontranszport-lánca képtelen működni (Campos és mtsai., 2012).

Az oxálecetsav mellett a kései ischaemiás események kivédésére, mérséklésére DHEA-t, egy másik endogén neuroprotektív tulajdonságú anyagot is alkalmaztunk. A DHEA számos kísérletben bizonyította neuroprotektív hatásait. A 12 nappal a nem teljes előagyi ischaemiát megelőzően DHEA kezelést kapott hím Wistar patkányokban jelentősen csökkent a neuronális sérülés mértéke (Li és mtsai., 1997). Intravénás DHEA kezeléssel

ischaemiás toleranciát tudtak kialakítani nyúlban (Lapchak és mtsai., 2000). A DHEA-nak és szulfátjának, mindezek mellett kompetitív GABA_A receptor antagonistaként való alkalmazását is leírták (Majewska, 1992), amely hatást a bicuculline GABA_A receptor antagonista adásával gátolni lehetett, mert a DHEA neuroprotektív jellegét nem engedte megnyilvánulni (Lapchak és mtsai., 2000). *In vitro* kísérletekben is megszűnt a DHEA neuroprotektív hatása, ha azt a GABA_A agonista barbituráttal, vagy antagonista picrotoxinnal együtt adták (Kaasik és mtsai., 2001). A DHEA neuroprotektívnek mutatkozott az α -amino-3-hidroxi-5-methylisoxasole-4-propionát (AMPA) és a kainát receptorhoz köthető excitotoxicitás kivédésében is, valamint a subcutan adott DHEA képes volt az NMDA excitotoxicitásból adódó hippocampális lézió méretének csökkentésére is (Kimonides és mtsai., 1998). A DHEA továbbá *in vitro*, 50nM és 100nM koncentrációban neuronális prekursor sejtekben működésbe hozza az Akt kinázt, ami egy szerin-threonin protein kináz (Zhang és mtsai., 2002), az Akt kináz pedig gátolja az ischaemiás állapotot követő apoptotikus folyamatokat, és ezzel egyúttal hozzájárul az idegsejtek túléléséhez is (Downward, 1998).

A fentiekben részletezett kísérleti adatok alapján a DHEA-t választottuk a Wistar 4VO modellre alkalmazott neuroprotektív stratégiánk hatásának erősítéséhez, ezzel kialakítva az oxálecetsavat és DHEA-t tartalmazó kombinált kezelést. Az oxálecetsav alkalmazott dózisának megszabásakor figyelembe kellett venni azt is, hogy ez az anyag nagy koncentrációban a vér kalcium ionjaival képes kalcium-oxalát kristályok kialakítására (Chutipongtanate és mtsai., 2010). A beadott koncentrációt tehát jóval kisebbre állítottuk be, mint azon kísérletek esetében, ahol traumás fejsérülést követően már akár neurológiai vizsgálatokkal is kimutatható volt a neuroprotektó (Zlotnik és mtsai., 2009; Zlotnik és mtsai., 2012). Ezidáig 4VO kísérletekben nem tesztelték az oxálecetsav védőhatását. A DHEA dózisának kialakításakor az volt az elsődleges szempont, hogy a neuroszteroid ösztrogénné vagy tesztoszteronná történő átalakulását megelőzzük, annak érdekében, hogy ténylegesen a DHEA élettani hatásaiból adódó neuroprotektóit mérhessük meg. Li és csoportja az általunk választott dózissal azonos mennyiségű tesztoszteront adott be 4VO-t követően, és nem tapasztaltak a DHEA kezelés eredményéhez hasonló neuroprotektóit (Li és mtsai., 2009).

A jövőben az oxálecetsav önmagában, illetve az ugyancsak endogén természetű DHEA-val kombináltan alkalmazva, új területeket nyithat a neuroprotektó irányába. A Glu receptor antagonistákkal történő kísérletes megközelítéshez, és a mindeddig sikertelen klinikai próbálkozásokhoz képest az oxálecetsav hatása teljesen más mechanizmuson alapul,

ugyanis a Glu-scavengerek aktivitása egy visszacsatolás folytán önszabályzó, hiszen a Glu vérből az agyba történő áramlása lelassul, ha a transzportereket aktiváló Glu koncentráció a küszöbérték alá esik. Emellett a Glu-savengerek nincsenek közvetlen hatással az ionotróp Glu receptorokra, míg az antagonisták nyilvánvalóan igen és így előbbiek nem akadályozzák meg az agyi sérülések során beinduló „neuroepair” folyamatokat, amelyeket a Glu indít el (Biegon és mtsai., 2004).

A kombinált kezelés alkalmazásával jelentősen jobb eredményeket értünk el, mint az oxálecetsav és a DHEA kezeléssel külön-külön. Az oxálecetsav dózist így nem volt szükséges tovább növelni az erősebb neuroprotektív hatás elérésének érdekében.

6. Összefoglaló

Az agyi vérellátás zavara ischaemiás vagy haemorrhagiás sztrók esetében egy adott központi idegrendszeri területet érint, míg a szívmegállásból adódó globális ischaemia bekövetkeztekor a teljes szervezet, és vele együtt az idegrendszer valamennyi területe oxigén- és szubsztráthiányban szenved. Az agyérkatasztrófákkal, hipoperfúziós patológiás állapotokkal foglalkozó kutatásokban többféle ischaemiás állatmodellt is kialakítottak annak érdekében, hogy a különböző kóros állapotokat minél jobb közelítéssel reprodukálják az állatkísérletek során. A teljes, globális agyi ischaemia kialakítására alkalmas az úgynevezett 4 ér-elzárás módszere (4VO, 4-vessel-occlusion), amelyben a nagyagy vérellátása meghatározott időre megszűnik. Több, egymástól független kutatócsoport is leírta már az emberben kialakuló ischaemiás állapotokból és a kísérleti állatokban előidézett, hasonló körülményeket kialakító ischaemiás beavatkozásokból származó adatok jelentős eltéréseit. Az irodalomból tudhatjuk azt, hogy vaszkuláris anatómiai különbségek nemcsak a különböző fajok között, hanem az eltérő törzsek között, de akár állattörzsekben belül is felfedezhetők. A Wistar és a Sprague-Dawley (SD) patkánytörzsek élettani folyamatai számos tekintetben eltérnek egymástól. A két törzs közötti különbségeket leírták már a magatartás szintjén, a tanulás és memória folyamataiban, az enzimatis aktivitás és a génexpresszió szintjén, valamint fokális ischaemiás inzultus hatásának, kimenetelének tekintetében is (Markgraf és mtsai., 1993; Walberer és mtsai., 2006). Mind a Wistar, mind az SD széles körben alkalmazott patkánytörzsek az agyi ischaemia kutatásában, mindkettőt gyakran használják globális ischaemiás modellek kialakításához is, mint amilyen a 4VO modell. Ezidáig azonban összehasonlító jelleggel nem írták le a Wistar és az SD patkánytörzsekben a globális ischaemia hatását.

A 4VO műtét alkalmazása során jelentős eltéréseket fedeztünk fel a Wistar és az SD patkánytörzsek között. Korábbi tanulmányok megerősítették azt, hogy a citoszolban tartósan megnövekedett Ca^{2+} koncentráció kiemelkedő szerepet játszik a funkciókárosodás és a sejtpusztulás kialakulásában. Az ischaemiás inzultus után egy második Ca^{2+} koncentráció-növekedés történik, amely a későbbi apoptotikus folyamatokért felelős. A lecsökkent áramlású ischaemiás periódusban szabadgyökök keletkezhetnek, amelyek befolyásolják az idegsejtekből történő serkentő aminosav felszabadulást, ez pedig visszahat a szabadgyökök képződésének folyamataira. Így tehát ha a Wistar és az SD patkánytörzsek

között különbségek mutatkoznak a 4VO ischaemiás periódus alatti nagyagyi vérellátottságban (CBF, cerebral blood flow), akkor ez magyarázatul szolgálhat az általunk tapasztalt különbségek mibenlétére.

Második kísérleti sorozatunkban egy lehetséges neuroprotektív stratégia tesztelését végeztük el a hippocampus CA1-es régiójában, két endogén természetű anyaggal 4VO modellben. Az ischaemiás inzultus hatására beinduló folyamatok pontos időbeli behatárolása kiemelten fontos a hatásos sztróktérapiák megtervezésekor. Rögtön az ischaemiás állapot következtében megjelenő nagy mennyiségű glutamát (Glu) az N-metil-D-aszpartát (NMDA) receptorokon keresztül fokozza az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációt, és egy öngerjesztő folyamat beindításával további Glu felszabadulást eredményez, felszabadítva további Ca^{2+} -ot az intracelluláris raktárakból. A glia sejteken lévő serkentő neurotransmitter transzporterek (EAAT, excitatory amino acid transporter) aktiválódnak ugyan, működésük azonban „fordított” irányúvá válik a magas Glu szint miatti tartós depolarizáció következtében. Az EAAT-k ugyanakkor megtalálhatók az agyi endothel sejtek membránjában, melyek membránpotenciálja sokkal stabilabb ischaemiás állapotban. A Glu koncentrációja az ischaemia következményeként fellépő depolarizációból adódóan tovább nő az intersticiális folyadékban (ISF, interstitial fluid), és a sejtek túlserkentésével percekben mérhető idő alatt excitotoxikus állapotot hoz létre. Feltehetően az ISF extrém módon magas Glu koncentrációjának csökkentése egy lehetséges neuroprotektív stratégia hatékony támadási pontja lehet. A vérplazma Glu koncentrációjának csökkentésével növelhető a gradiens az ISF és a vér között, ezzel egy agyból a vérplazma felé irányuló netto Glu-efflux hozható létre, amely Glu koncentrációcsökkenést okoz az ISF-ben. A vér Glu szintjét tehát csökkenthetjük a glutamát-oxálacetát transzamináz (GOT) enzim aktivitásán keresztül. Oxálecetsavat adva a GOT enzim által mediált biokémiai átalakításhoz, melynek során az enzim a glutamátot 2- α -ketoglutaráttá, az oxálecetsavat pedig aszpartáttá alakítja, lecsökken a vérplazma Glu koncentrációja. Ezen a jelenségen alapul a Glu-scavenging módszere. A sejtek károsodott funkciói, és a magas intracelluláris Ca^{2+} koncentráció miatt bekapcsol az apoptotikus kaszkád, melynek lefutása, és az ezzel egy időben kialakuló gyulladásos folyamatok megindulása órákkal az ischaemiás periódus után kezdődik meg. Lefolyásuk az ischaemia mértékétől függően napokig, hetekig tarthat. Az inflammatórikus folyamatok során az ischaemia érintette agyi régióban jellemzően megemelkedik az interleukin-1 és az interleukin-6 koncentrációja. Fokozódik továbbá a tumor nekrosis faktor- α (TNF α) által kiváltott NF- κ B („nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells”) transzkripció faktor kifejeződése, amely a gyulladás, az

autoimmun válasz, a sejtosztódás és az apoptózis folyamataiban is központi szerepet játszik, az ezeket a mechanizmusokat irányító gének szabályzásával. Ezek a gyulladásos folyamatok mérsékelhetők egy endogén neuroszteroid, a dehidroepiandroszteron (DHEA) neuroprotektív hatásának köszönhetően, amely képes gátolni az NF- κ B aktivációját és csökkenti az interleukinok mennyiségét. A DHEA egy másik fontos neuroprotektív aktivitása, a Ca^{2+} ionok túlzott mértékű, mitokondriális mátrixba való beáramlásának megakadályozása, az extrém módon megemelkedett intracelluláris Ca^{2+} koncentráció kialakulásakor, amely az ischaemiás állapotok jellegzetes körülménye. A DHEA ezen kívül működésbe hozza az Akt kinázt, egy szerin-threonin protein kinázt, amely aktív formájában bizonyítottan gátolja az ischaemiás állapotot követő apoptotikus folyamatokat. Az általunk alkalmazott kombinált kezelés képes lehet a jelentős sejtpusztulást és funkciókárosodást eredményező rövid távú, excitotoxikus, és hosszú távú poszt-ischaemikus folyamatok mérséklésére egy kettős támadáspontú kombinált kezelés alkalmazásával.

7. Summary

Disturbance of the blood supply of the brain is one of the most frequent cerebrovascular diseases. Only a particular area of the brain is involved during hemorrhagic and ischemic stroke, but the whole body, including all regions of the brain, suffers from the lack of oxygen and substrates when cardiac arrest occurs. Accordingly, different experimental models of ischemia are required which correspond to the various clinical pathophysiological situations. The 4-vessel-occlusion (4VO) model is suitable for inducing global cerebral ischemia in experimental animals. Many independent research groups have reported significant discrepancies between the data recorded in human pathophysiological states and the data obtained from animal experiments. It should be borne in mind that there is a considerable diversity in cerebral vascular architecture in the different species, and there are also interstrain and even intrastrain anatomical differences in the vasculature of rats. There are striking differences in the physiological functions of Sprague-Dawley (SD) and Wistar rat strains at many levels, e.g. behavior, learning and memory, enzymatic activity, gene expression and focal ischemic injury. Both Wistar and SD rats are widely used in experiments involving global ischemia, such as 4VO. No previous data demonstrate whether any difference in cerebral cortical activity and the consequent histological changes can be observed following global cerebral ischemia in Wistar and SD rats supplied by the same vendor (Charles-River Laboratories). It should also be emphasized that such differences can greatly influence the results of experiments and even the clinical application of neuroprotective strategies.

We discovered striking differences between SD and Wistar rats when we applied 4VO surgical intervention. It has already been published that a highly increased cytosolic concentration of Ca^{2+} ions plays a prominent role in the functional and cellular loss after ischemia. A second elevation of Ca^{2+} occurs after the ischemic insult, which is responsible for the apoptotic effects following hypoperfusion. Free radicals are formed as a result of the reduced blood flow. These influence the excitatory transmitter release of neurons which can enhance the processes of free radical formation. Thus, if there are huge discrepancies in the cerebral blood flow (CBF) of SD and Wistar rats during 4VO, this can explain the differences seen between the two rat strains.

In a second series of experiments we investigated a possible new neuroprotective strategy applied as combined treatment with two endogenous compounds. The treatment was designed to moderate both the early and the late ischemic events and to protect the

hippocampal pyramids from the loss of synaptic function and from cell death. The excess glutamate (Glu) which appears in the interstitial fluid (ISF) immediately after the start of ischemic period, increases the intracellular Ca^{2+} concentration through the activation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. The high Ca^{2+} concentration leads to the release of Ca^{2+} from the intracellular storages. Although glial cells have their excitatory amino acid transporters (EAAT) activated, these work in a reversed way when the Glu level is extremely high. The membrane potential of the endothelial cells with EAAT transporters in their membrane is much more stable during ischemic conditions and may therefore reduce the excess Glu when ischemia occurs. It is reasonable to say that the extremely high Glu level of the ISF could be a valuable point of attack a neuroprotective strategy. The concentration gradient between the ISF and the blood plasma can be increased by decreasing the Glu concentration of the blood plasma by activating the glutamate-oxaloacetate transaminase (GOT) enzyme. Through its transaminase activity GOT converts glutamate to 2- α -ketoglutarate and oxaloacetate (OxAc) to aspartate. The Glu efflux from the brain to the blood is enhanced when the Glu level in the blood plasma decreases. This is the phenomenon of Glu scavenging. Early consequences of the ischemic insult are handled by the Glu-scavenger OxAc, but late ischemic events such as inflammatory events take place a few hours or days after the insult. During these processes the affected area is characterized by elevated interleukin-1 and interleukin-6 concentration. The expression of tumor necrosis factor α (TNF α)-activated NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), which regulates the major genes responsible for inflammation, cell proliferation and apoptosis, is also increased. Dehydroepiandrosterone (DHEA), an endogenous neurosteroid, has been proved to moderate inflammation due to its numerous neuroprotective effects. DHEA is capable of decreasing the activation of NF- κ B and the level of interleukins. Under ischemic conditions, when the extremely high intracellular Ca^{2+} concentration is close to its cytotoxic level, DHEA treatment can prevent Ca^{2+} ions from flowing into the mitochondrial matrix. Furthermore, DHEA activates Akt kinase, a serine-threonine kinase, which is known to contribute to inhibition of the apoptotic cascade in its active form.

With our combined treatment, we are able to moderate both the early ischemic and the late ischemic events following an ischemic period which can result in significant functional and cell loss. Thus, the application of combined treatment to diminish excitotoxic and inflammatory processes is expected to lead to much more effective neuroprotection.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Dr. Toldi József tanszékvezető professzor úrnak, a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék vezetőjének, aki megtisztelt bizalmával és biztosította számomra a kísérleteim elvégzéséhez szükséges anyagi és szellemi feltételeket. Köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek Dr. Farkas Tamás egyetemi docensnek, aki szakmai tapasztalatával, hasznos elméleti és gyakorlati tanácsaival, észrevételeivel rengeteget segített, emellett türelmével és odafigyelésével emberileg is mindig támogatott. Köszönettel tartozom Dr. Kis Zsoltnak, a tanszéki hisztológiai labor vezetőjének, Dr. Sente Magdolnának a tanszéki epilepszia labor vezetőjének, aki az *in vivo* kísérleteimet tette lehetővé laborjában. Köszönettel tartozom továbbá Dr. Kincses Tamásnak a Neurológiai Klinika munkatársának. Külön köszönöm Dr. Marosi Máténak, Dr. Nagy Dávidnak, Oláh Gáspárnak, Gellért Leventének, Kocsis Kittinek, Knapp Leventének, Herédi Juditnak hogy számíthattam a segítségükre, és észrevételeikkel, munkájukkal hozzájárultak a dolgozatom elkészítéséhez.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm szüleimnek, hogy a munkámhoz szükséges háttérrel megteremtették, barátaimnak és barátnőmnek, Adélnak, hogy mindig számíthatok rájuk, és mellettem állnak.

Irodalomjegyzék

1. Asai, S., Y. Iribe, T. Kohno and K. Ishikawa (1996). "Real time monitoring of biphasic glutamate release using dialysis electrode in rat acute brain ischemia." Neuroreport **7**(5): 1092-1096.
2. Baker, A. J., R. J. Moulton, V. H. MacMillan and P. M. Shedden (1993). "Excitatory amino acids in cerebrospinal fluid following traumatic brain injury in humans." J Neurosurg **79**(3): 369-372.
3. Bao, J. X., E. R. Kandel and R. D. Hawkins (1997). "Involvement of pre- and postsynaptic mechanisms in posttetanic potentiation at Aplysia synapses." Science **275**(5302): 969-973.
4. Barone, F. C., G. Z. Feuerstein and R. F. White (1997). "Brain cooling during transient focal ischemia provides complete neuroprotection." Neurosci Biobehav Rev **21**(1): 31-44.
5. Barone, F. C., D. J. Knudsen, A. H. Nelson, G. Z. Feuerstein and R. N. Willette (1993). "Mouse strain differences in susceptibility to cerebral ischemia are related to cerebral vascular anatomy." J Cereb Blood Flow Metab **13**(4): 683-692.
6. Barone, F. C., W. J. Price, R. F. White, R. N. Willette and G. Z. Feuerstein (1992a). "Genetic hypertension and increased susceptibility to cerebral ischemia." Neurosci Biobehav Rev **16**(2): 219-233.
7. Barone, F. C., D. B. Schmidt, L. M. Hillegass, W. J. Price, R. F. White, G. Z. Feuerstein, R. K. Clark, E. V. Lee, D. E. Griswold and H. M. Sarau (1992b). "Reperfusion increases neutrophils and leukotriene B4 receptor binding in rat focal ischemia." Stroke **23**(9): 1337-1347; discussion 1347-1338.
8. Berl, S. and T. L. Frigyesi (1969). "Effect of reserpine on the turnover of glutamate, glutamine, aspartate and GABA labeled with [1-14C]acetate in caudate nucleus, thalamus and sensorimotor cortex(cat)." Brain Res **14**(3): 683-695.
9. Biegon, A., P. A. Fry, C. M. Paden, A. Alexandrovich, J. Tsenter and E. Shohami (2004). "Dynamic changes in N-methyl-D-aspartate receptors after closed head injury in mice: Implications for treatment of neurological and cognitive deficits." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(14): 5117-5122.
10. Bliss, T. V. and T. Lomo (1973). "Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path." J Physiol **232**(2): 331-356.
11. Bortolotto, Z. A. and G. L. Collingridge (1993). "Characterisation of LTP induced by the activation of glutamate metabotropic receptors in area CA1 of the hippocampus." Neuropharmacology **32**(1): 1-9.
12. Brint, S., M. Jacewicz, M. Kiessling, J. Tanabe and W. Pulsinelli (1988). "Focal brain ischemia in the rat: methods for reproducible neocortical infarction using tandem occlusion of the distal middle cerebral and ipsilateral common carotid arteries." J Cereb Blood Flow Metab **8**(4): 474-485.
13. Brostrom, M. A. and C. O. Brostrom (2003). "Calcium dynamics and endoplasmic reticular function in the regulation of protein synthesis: implications for cell growth and adaptability." Cell Calcium **34**(4-5): 345-363.
14. Brown, J. O. (1966). "The morphology of circulus arteriosus cerebri in rats." Anat Rec **156**(1): 99-106.
15. Buchan, A. M., D. Xue and A. Slivka (1992). "A new model of temporary focal neocortical ischemia in the rat." Stroke **23**(2): 273-279.

16. Bullock, R., A. Zauner, J. J. Woodward, J. Myseros, S. C. Choi, J. D. Ward, A. Marmarou and H. F. Young (1998). "Factors affecting excitatory amino acid release following severe human head injury." J Neurosurg **89**(4): 507-518.
17. Burda, J., V. Danielisova, M. Nemethova, M. Gottlieb, M. Matiasova, I. Domorakova, E. Mechirova, M. Ferikova, M. Salinas and R. Burda (2006). "Delayed postconditioning initiates additive mechanism necessary for survival of selectively vulnerable neurons after transient ischemia in rat brain." Cell Mol Neurobiol **26**(7-8): 1141-1151.
18. Cali, T., D. Ottolini and M. Brini (2012). "Mitochondrial Ca(2+) and neurodegeneration." Cell Calcium **52**(1): 73-85.
19. Campos, F., T. Sobrino, P. Ramos-Cabrer and J. Castillo (2012). "Oxaloacetate: a novel neuroprotective for acute ischemic stroke." Int J Biochem Cell Biol **44**(2): 262-265.
20. Caragine, L. P., H. K. Park, F. G. Diaz and J. W. Phillis (1998). "Real-time measurement of ischemia-evoked glutamate release in the cerebral cortex of four and eleven vessel rat occlusion models." Brain Res **793**(1-2): 255-264.
21. Cardounel, A., W. Regelson and M. Kalimi (1999). "Dehydroepiandrosterone protects hippocampal neurons against neurotoxin-induced cell death: mechanism of action." Proc Soc Exp Biol Med **222**(2): 145-149.
22. Castillo, J., A. Davalos, J. Naveiro and M. Noya (1996). "Neuroexcitatory amino acids and their relation to infarct size and neurological deficit in ischemic stroke." Stroke **27**(6): 1060-1065.
23. Celsis, P., A. Agniel, M. Puel, A. Rascol and J. P. Marc-Vergnes (1987). "Focal cerebral hypoperfusion and selective cognitive deficit in dementia of the Alzheimer type." J Neurol Neurosurg Psychiatry **50**(12): 1602-1612.
24. Charalampopoulos, I., E. Dermitzaki, L. Vardouli, C. Tsatsanis, C. Stournaras, A. N. Margioris and A. Gravanis (2005). "Dehydroepiandrosterone sulfate and allopregnanolone directly stimulate catecholamine production via induction of tyrosine hydroxylase and secretion by affecting actin polymerization." Endocrinology **146**(8): 3309-3318.
25. Chutipongtanate, S. and V. Thongboonkerd (2010). "Red blood cell membrane fragments but not intact red blood cells promote calcium oxalate monohydrate crystal growth and aggregation." J Urol **184**(2): 743-749.
26. Dal-Re, R. (2011). "Worldwide clinical interventional studies on leading causes of death: a descriptive analysis." Ann Epidemiol **21**(10): 727-731.
27. Danbolt, N. C. (2001). "Glutamate uptake." Prog Neurobiol **65**(1): 1-105.
28. Davalos, A., A. Shuaib and N. G. Wahlgren (2000). "Neurotransmitters and pathophysiology of stroke: evidence for the release of glutamate and other transmitters/mediators in animals and humans." J Stroke Cerebrovasc Dis **9**(6 Pt 2): 2-8.
29. De Jong, G. I., E. Farkas, C. M. Stienstra, J. R. Plass, J. N. Keijser, J. C. de la Torre and P. G. Luiten (1999). "Cerebral hypoperfusion yields capillary damage in the hippocampal CA1 area that correlates with spatial memory impairment." Neuroscience **91**(1): 203-210.
30. Dietrich, W. D., R. Busto, B. D. Watson, P. Scheinberg and M. D. Ginsberg (1987). "Photochemically induced cerebral infarction. II. Edema and blood-brain barrier disruption." Acta Neuropathol **72**(4): 326-334.
31. Dingledine, R., C. J. McBain and J. O. McNamara (1990). "Excitatory amino acid receptors in epilepsy." Trends Pharmacol Sci **11**(8): 334-338.

32. Dirnagl, U., R. P. Simon and J. M. Hallenbeck (2003). "Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection." Trends Neurosci **26**(5): 248-254.
33. Dobbin, J., H. A. Crockard and R. Ross-Russell (1989). "Transient blood-brain barrier permeability following profound temporary global ischaemia: an experimental study using ¹⁴C-AIB." J Cereb Blood Flow Metab **9**(1): 71-78.
34. Downward, J. (1998). "Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt." Curr Opin Cell Biol **10**(2): 262-267.
35. Drewes, L. R., W. P. Conway and D. D. Gilboe (1977a). "Blood-brain amino acid transport and content during anoxia and reoxygenation." Am J Physiol **233**(4): E326-330.
36. Drewes, L. R., W. P. Conway and D. D. Gilboe (1977b). "Net amino acid transport between plasma and erythrocytes and perfused dog brain." Am J Physiol **233**(4): E320-325.
37. Duverger, D. and E. T. MacKenzie (1988). "The quantification of cerebral infarction following focal ischemia in the rat: influence of strain, arterial pressure, blood glucose concentration, and age." J Cereb Blood Flow Metab **8**(4): 449-461.
38. Faden, A. I., P. Demediuk, S. S. Panter and R. Vink (1989). "The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury." Science **244**(4906): 798-800.
39. Farkas, E. and P. G. Luiten (2001). "Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease." Prog Neurobiol **64**(6): 575-611.
40. Farkas, E., P. G. Luiten and F. Bari (2007). "Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases." Brain Res Rev **54**(1): 162-180.
41. Foreman, B. and J. Claassen (2012). "Quantitative EEG for the detection of brain ischemia." Crit Care **16**(2): 216.
42. Fuzik, J., L. Gellert, G. Olah, J. Heredi, K. Kocsis, L. Knapp, D. Nagy, Z. T. Kincses, Z. Kis, T. Farkas and J. Toldi (2012). "Fundamental interstrain differences in cortical activity between Wistar and Sprague-Dawley rats during global ischemia." Neuroscience **228C**: 371-381.
43. Garcia-Galloway, E., C. Arango, S. Pons and I. Torres-Aleman (2003). "Glutamate excitotoxicity attenuates insulin-like growth factor-I prosurvival signaling." Mol Cell Neurosci **24**(4): 1027-1037.
44. Gellert, L., J. Fuzik, A. Goblos, K. Sarkozi, M. Marosi, Z. Kis, T. Farkas, I. Szatmari, F. Fulop, L. Vecsei and J. Toldi (2011). "Neuroprotection with a new kynurenic acid analog in the four-vessel occlusion model of ischemia." Eur J Pharmacol **667**(1-3): 182-187.
45. Geocadin, R. G., D. L. Sherman, H. Christian Hansen, T. Kimura, E. Niedermeyer, N. V. Thakor and D. F. Hanley (2002). "Neurological recovery by EEG bursting after resuscitation from cardiac arrest in rats." Resuscitation **55**(2): 193-200.
46. Gervitz, L. M., D. G. Davies, K. Omidvar and J. C. Fowler (2003). "The effect of acute hypoxemia and hypotension on adenosine-mediated depression of evoked hippocampal synaptic transmission." Exp Neurol **182**(2): 507-517.
47. Gervitz, L. M., L. O. Lutherer, D. G. Davies, J. H. Pirch and J. C. Fowler (2001). "Adenosine induces initial hypoxic-ischemic depression of synaptic transmission in the rat hippocampus in vivo." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **280**(3): R639-645.
48. Ginsberg, M. D. and R. Busto (1989). "Rodent models of cerebral ischemia." Stroke **20**(12): 1627-1642.

49. Gottlieb, M., Y. Wang and V. I. Teichberg (2003). "Blood-mediated scavenging of cerebrospinal fluid glutamate." J Neurochem **87**(1): 119-126.
50. Gouriou, Y., N. Demareux, P. Bijlenga and U. De Marchi (2011). "Mitochondrial calcium handling during ischemia-induced cell death in neurons." Biochimie **93**(12): 2060-2067.
51. Guyot, L. L., F. G. Diaz, M. H. O'Regan, S. McLeod, H. Park and J. W. Phillis (2001). "Real-time measurement of glutamate release from the ischemic penumbra of the rat cerebral cortex using a focal middle cerebral artery occlusion model." Neurosci Lett **299**(1-2): 37-40.
52. Hanausek-Walaszek, M., M. Del Rio and A. K. Adams (1990). "Structural and immunological identity of p65 tumor-associated factors from rat and mouse hepatocarcinomas." Prog Clin Biol Res **331**: 109-120.
53. He, Z., L. Cui, S. S. Wu, X. Y. Li, J. W. Simpkins, M. McKinney and A. L. Day (2004). "Increased severity of acute cerebral ischemic injury correlates with enhanced stem cell induction as well as with predictive behavioral profiling." Curr Neurovasc Res **1**(5): 399-409.
54. Hedrich, H. J., (2000). "History, strains and models. The laboratory rat." Academic Press, London, pp. 3-8.
55. Hermann, D. M., K. A. Hossmann and G. Mies (2004). "Expression of c-jun, mitogen-activated protein kinase phosphatase-1, caspase-3 and glial fibrillary acidic protein following cortical cold injury in rats: relationship to metabolic disturbances and delayed cell death." Neuroscience **123**(2): 371-379.
56. Hermann, D. M., G. Mies and K. A. Hossmann (1999). "Lesion-remote metabolic changes after neocortical cold injury in rats." Neuroreport **10**(4): 759-763.
57. Heurteaux, C., I. Lauritzen, C. Widmann and M. Lazdunski (1995). "Essential role of adenosine, adenosine A1 receptors, and ATP-sensitive K⁺ channels in cerebral ischemic preconditioning." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(10): 4666-4670.
58. Hill, B. A., P. C. Brown, K. H. Preisegger and J. A. Silverman (1996). "Regulation of *mdr1b* gene expression in Fischer, Wistar and Sprague-Dawley rats in vivo and in vitro." Carcinogenesis **17**(3): 451-457.
59. Hossmann, K. A. (2008). "Cerebral ischemia: models, methods and outcomes." Neuropharmacology **55**(3): 257-270.
60. Hou, S. T. and J. P. MacManus (2002). "Molecular mechanisms of cerebral ischemia-induced neuronal death." Int Rev Cytol **221**: 93-148.
61. Ilie, A., D. Ciocan, A. O. Constantinescu, A. M. Zagrean, D. A. Nita, L. Zagrean and M. Moldovan (2009). "Endogenous activation of adenosine A1 receptors promotes post-ischemic electrocortical burst suppression." Neuroscience **159**(3): 1070-1078.
62. Imamura, Y. and H. Shimada (2005). "Differential pharmacokinetics of acetohexamide in male Wistar-Imamichi and Sprague-Dawley rats: role of microsomal carbonyl reductase." Biol Pharm Bull **28**(1): 185-187.
63. Isaac, J. T., A. Luthi, M. J. Palmer, W. W. Anderson, T. A. Benke and G. L. Collingridge (1998). "An investigation of the expression mechanism of LTP of AMPA receptor-mediated synaptic transmission at hippocampal CA1 synapses using failures analysis and dendritic recordings." Neuropharmacology **37**(10-11): 1399-1410.
64. Iwasaki, Y., M. Asai, M. Yoshida, T. Nigawara, M. Kambayashi and N. Nakashima (2004). "Dehydroepiandrosterone-sulfate inhibits nuclear factor-kappaB-dependent transcription in hepatocytes, possibly through antioxidant effect." J Clin Endocrinol Metab **89**(7): 3449-3454.

65. Jatzke, C., J. Watanabe and L. P. Wollmuth (2002). "Voltage and concentration dependence of Ca(2+) permeability in recombinant glutamate receptor subtypes." J Physiol **538**(Pt 1): 25-39.
66. Johnston, M. V., W. H. Trescher, A. Ishida and W. Nakajima (2001). "Neurobiology of hypoxic-ischemic injury in the developing brain." Pediatr Res **49**(6): 735-741.
67. Johnston, S. C., S. Mendis and C. D. Mathers (2009). "Global variation in stroke burden and mortality: estimates from monitoring, surveillance, and modelling." Lancet Neurol **8**(4): 345-354.
68. Jordan, K. G. (2004). "Emergency EEG and continuous EEG monitoring in acute ischemic stroke." J Clin Neurophysiol **21**(5): 341-352.
69. Kaasik, A., A. Kalda, K. Jaako and A. Zharkovsky (2001). "Dehydroepiandrosterone sulphate prevents oxygen-glucose deprivation-induced injury in cerebellar granule cell culture." Neuroscience **102**(2): 427-432.
70. Kaasik, A., D. Safiulina, A. Kalda and A. Zharkovsky (2003). "Dehydroepiandrosterone with other neurosteroids preserve neuronal mitochondria from calcium overload." J Steroid Biochem Mol Biol **87**(1): 97-103.
71. Kaminski, R. M., H. Marini, W. J. Kim and M. A. Rogawski (2005). "Anticonvulsant activity of androsterone and etiocholanolone." Epilepsia **46**(6): 819-827.
72. Kandel, E. R. and J. H. Schwartz (1982). "Molecular biology of learning: modulation of transmitter release." Science **218**(4571): 433-443.
73. Karhunen, H., J. Jolkkonen, J. Sivenius and A. Pitkanen (2005). "Epileptogenesis after experimental focal cerebral ischemia." Neurochem Res **30**(12): 1529-1542.
74. Karishma, K. K. and J. Herbert (2002). "Dehydroepiandrosterone (DHEA) stimulates neurogenesis in the hippocampus of the rat, promotes survival of newly formed neurons and prevents corticosterone-induced suppression." Eur J Neurosci **16**(3): 445-453.
75. Kidwell, C. S. and S. Warach (2003). "Acute ischemic cerebrovascular syndrome: diagnostic criteria." Stroke **34**(12): 2995-2998.
76. Kimonides, V. G., N. H. Khatibi, C. N. Svendsen, M. V. Sofroniew and J. Herbert (1998). "Dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA-sulfate (DHEAS) protect hippocampal neurons against excitatory amino acid-induced neurotoxicity." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(4): 1852-1857.
77. Kimonides, V. G., M. G. Spillantini, M. V. Sofroniew, J. W. Fawcett and J. Herbert (1999). "Dehydroepiandrosterone antagonizes the neurotoxic effects of corticosterone and translocation of stress-activated protein kinase 3 in hippocampal primary cultures." Neuroscience **89**(2): 429-436.
78. Koenig, M. A., R. G. Geocadin, M. de Grouchy, J. Glasgow, S. Vimal, L. Restrepo and R. J. Wityk (2006). "Safety of induced hypertension therapy in patients with acute ischemic stroke." Neurocrit Care **4**(1): 3-7.
79. Lapchak, P. A., D. F. Chapman, S. Y. Nunez and J. A. Zivin (2000). "Dehydroepiandrosterone sulfate is neuroprotective in a reversible spinal cord ischemia model: possible involvement of GABA(A) receptors." Stroke **31**(8): 1953-1956; discussion 1957.
80. Lee, J. K., M. S. Park, Y. S. Kim, K. S. Moon, S. P. Joo, T. S. Kim, J. H. Kim and S. H. Kim (2007). "Photochemically induced cerebral ischemia in a mouse model." Surg Neurol **67**(6): 620-625; discussion 625.
81. Leigh, P. N. and B. S. Meldrum (1996). "Excitotoxicity in ALS." Neurology **47**(6 Suppl 4): S221-227.

82. Li, P. K., M. E. Rhodes, A. M. Burke and D. A. Johnson (1997). "Memory enhancement mediated by the steroid sulfatase inhibitor (p-O-sulfamoyl)-N-tetradecanoyl tyramine." Life Sci **60**(3): PL45-51.
83. Li, Z., S. Cui, Z. Zhang, R. Zhou, Y. Ge, M. Sokabe and L. Chen (2009). "DHEA-neuroprotection and -neurotoxicity after transient cerebral ischemia in rats." J Cereb Blood Flow Metab **29**(2): 287-296.
84. Li, Z., Q. Zhou, L. Li, R. Mao, M. Wang, W. Peng, Z. Dong, L. Xu and J. Cao (2005). "Effects of unconditioned and conditioned aversive stimuli in an intense fear conditioning paradigm on synaptic plasticity in the hippocampal CA1 area in vivo." Hippocampus **15**(6): 815-824.
85. Li, Z., R. Zhou, S. Cui, G. Xie, W. Cai, M. Sokabe and L. Chen (2006). "Dehydroepiandrosterone sulfate prevents ischemia-induced impairment of long-term potentiation in rat hippocampal CA1 by up-regulating tyrosine phosphorylation of NMDA receptor." Neuropharmacology **51**(5): 958-966.
86. Lipton, P. (1999). "Ischemic cell death in brain neurons." Physiol Rev **79**(4): 1431-1568.
87. Lloyd, D. P. (1949). "Post-tetanic potentiation of response in monosynaptic reflex pathways of the spinal cord." J Gen Physiol **33**(2): 147-170.
88. Majewska, M. D. (1992). "Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABAA receptor. Mechanism of action and physiological significance." Prog Neurobiol **38**(4): 379-395.
89. Maninger, N., O. M. Wolkowitz, V. I. Reus, E. S. Epel and S. H. Mellon (2009). "Neurobiological and neuropsychiatric effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate (DHEAS)." Front Neuroendocrinol **30**(1): 65-91.
90. Markgraf, C. G., S. Kraydieh, R. Prado, B. D. Watson, W. D. Dietrich and M. D. Ginsberg (1993). "Comparative histopathologic consequences of photothrombotic occlusion of the distal middle cerebral artery in Sprague-Dawley and Wistar rats." Stroke **24**(2): 286-292; discussion 292-283.
91. Marosi, M., J. Fuzik, D. Nagy, G. Rakos, Z. Kis, L. Vecsei, J. Toldi, A. Ruban-Matuzani, V. I. Teichberg and T. Farkas (2009). "Oxaloacetate restores the long-term potentiation impaired in rat hippocampus CA1 region by 2-vessel occlusion." Eur J Pharmacol **604**(1-3): 51-57.
92. Marosi, M., G. Rakos, H. Robotka, H. Nemeth, K. Sas, Z. Kis, T. Farkas, G. Lur, L. Vecsei and J. Toldi (2006). "Hippocampal (CA1) activities in Wistar rats from different vendors. Fundamental differences in acute ischemia." J Neurosci Methods **156**(1-2): 231-235.
93. Mathers, C. D., T. Boerma and D. Ma Fat (2009). "Global and regional causes of death." Br Med Bull **92**: 7-32.
94. Meneses, A., T. Ponce-Lopez, R. Tellez, R. Gonzalez, C. Castillo and A. Gasbarri (2011). "Effects of d-amphetamine on short- and long-term memory in spontaneously hypertensive, Wistar-Kyoto and Sprague-Dawley rats." Behav Brain Res **216**(1): 472-476.
95. Moldovan, M., A. M. Zagrean, S. Avramescu, V. Savaran and L. Zagrean (2004). "Electro-cortical signs of early neuronal damage following transient global cerebral ischemia in rat." J Cell Mol Med **8**(1): 135-140.
96. Morales, A. J., J. J. Nolan, J. C. Nelson and S. S. Yen (1994). "Effects of replacement dose of dehydroepiandrosterone in men and women of advancing age." J Clin Endocrinol Metab **78**(6): 1360-1367.
97. Mukherjee, D. and C. G. Patil (2011). "Epidemiology and the global burden of stroke." World Neurosurg **76**(6 Suppl): S85-90.

98. Nicholls, D. and D. Attwell (1990). "The release and uptake of excitatory amino acids." Trends Pharmacol Sci **11**(11): 462-468.
99. Nunn, J. A., E. LePeillet, C. A. Netto, H. Hodges, J. A. Gray and B. S. Meldrum (1994). "Global ischaemia: hippocampal pathology and spatial deficits in the water maze." Behav Brain Res **62**(1): 41-54.
100. O'Kane, R. L., I. Martinez-Lopez, M. R. DeJoseph, J. R. Vina and R. A. Hawkins (1999). "Na(+)-dependent glutamate transporters (EAAT1, EAAT2, and EAAT3) of the blood-brain barrier. A mechanism for glutamate removal." J Biol Chem **274**(45): 31891-31895.
101. Oldendorf, W. H. and J. Szabo (1976). "Amino acid assignment to one of three blood-brain barrier amino acid carriers." Am J Physiol **230**(1): 94-98.
102. Oliff, H. S., P. Coyle and E. Weber (1997). "Rat strain and vendor differences in collateral anastomoses." J Cereb Blood Flow Metab **17**(5): 571-576.
103. Oliff, H. S., P. Marek, B. Miyazaki and E. Weber (1996). "The neuroprotective efficacy of MK-801 in focal cerebral ischemia varies with rat strain and vendor." Brain Res **731**(1-2): 208-212.
104. Oliff, H. S., E. Weber, G. Eilon and P. Marek (1995a). "The role of strain/vendor differences on the outcome of focal ischemia induced by intraluminal middle cerebral artery occlusion in the rat." Brain Res **675**(1-2): 20-26.
105. Oliff, H. S., E. Weber, B. Miyazaki and P. Marek (1995b). "Infarct volume varies with rat strain and vendor in focal cerebral ischemia induced by transcranial middle cerebral artery occlusion." Brain Res **699**(2): 329-331.
106. Olmez, I. and H. Ozyurt (2012). "Reactive oxygen species and ischemic cerebrovascular disease." Neurochem Int **60**(2): 208-212.
107. Paxinos, G., C. R. Watson and P. C. Emson (1980). "AChE-stained horizontal sections of the rat brain in stereotaxic coordinates." J Neurosci Methods **3**(2): 129-149.
108. Pellegrini-Giampietro, D. E., G. Cherici, M. Alesiani, V. Carla and F. Moroni (1990). "Excitatory amino acid release and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage." J Neurosci **10**(3): 1035-1041.
109. Perel, P., I. Roberts, E. Sena, P. Wheble, C. Briscoe, P. Sandercock, M. Macleod, L. E. Mignini, P. Jayaram and K. S. Khan (2007). "Comparison of treatment effects between animal experiments and clinical trials: systematic review." BMJ **334**(7586): 197.
110. Phillis, J. W., L. M. Perkins, M. Smith-Barbour and M. H. O'Regan (1994). "Transmitter amino acid release from rat neocortex: complete versus incomplete ischemia models." Neurochem Res **19**(11): 1387-1392.
111. Plesnila, N., D. Friedrich, J. Eriskat, A. Baethmann and M. Stoffel (2003). "Relative cerebral blood flow during the secondary expansion of a cortical lesion in rats." Neurosci Lett **345**(2): 85-88.
112. Pulsinelli, W. A. and J. B. Brierley (1979). "A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat." Stroke **10**(3): 267-272.
113. Pulsinelli, W. A., D. E. Levy and T. E. Duffy (1983). "Cerebral blood flow in the four-vessel occlusion rat model." Stroke **14**(5): 832-834.
114. Rakos, G., Z. Kis, D. Nagy, G. Lur, T. Farkas, T. Hortobagyi, L. Vecsei and J. Toldi (2007). "Evans Blue fluorescence permits the rapid visualization of non-intact cells in the perilesional rim of cold-injured rat brain." Acta Neurobiol Exp (Wars) **67**(2): 149-154.

115. Rampil, I. J. and M. J. Laster (1992). "No correlation between quantitative electroencephalographic measurements and movement response to noxious stimuli during isoflurane anesthesia in rats." Anesthesiology **77**(5): 920-925.
116. Rex, A., J. P. Voigt, C. Gustedt, S. Beckett and H. Fink (2004). "Anxiolytic-like profile in Wistar, but not Sprague-Dawley rats in the social interaction test." Psychopharmacology (Berl) **177**(1-2): 23-34.
117. Ricart, T. M., X. Jiao, K. C. Pang, K. D. Beck and R. J. Servatius (2011). "Classical and instrumental conditioning of eyeblink responses in Wistar-Kyoto and Sprague-Dawley rats." Behav Brain Res **216**(1): 414-418.
118. Rosenblum, W. I. and F. El-Sabban (1977). "Effects of combined parenchymal and vascular injury on platelet aggregation in pial arterioles of living mice: evidence for release of aggregate-inhibiting materials." Stroke **8**(6): 691-693.
119. Rossen R., Kabat H. and Anderson J. (1943). "Acute arrest of cerebral circulation." Arch Neurol Psychiatry **50**: 510-28.
120. Saito, K., N. Sakai, H. S. Kim, M. Ishizuka, A. Kazusaka and S. Fujita (2004). "Strain differences in diazepam metabolism at its three metabolic sites in sprague-dawley, brown norway, dark agouti, and wistar strain rats." Drug Metab Dispos **32**(9): 959-965.
121. Sands, D. E. and G. H. Chamberlain (1952). "Treatment of inadequate personality in juveniles by dehydroisoandrosterone; preliminary report." Br Med J **2**(4775): 66-68.
122. Sas, K., H. Robotka, E. Rozsa, M. Agoston, G. Szenasi, G. Gigler, M. Marosi, Z. Kis, T. Farkas, L. Vecsei and J. Toldi (2008). "Kynurenine diminishes the ischemia-induced histological and electrophysiological deficits in the rat hippocampus." Neurobiol Dis **32**(2): 302-308.
123. Sasaki, S. and H. Schneider (1976). "Supravital diffusion of fluorescent Evans blue in brain and spinal cord tissue." Acta Neuropathol **36**(4): 363-368.
124. Sauerbeck, L. R. (2006). "Primary stroke prevention." Am J Nurs **106**(11): 40-41, 43-45, 48-49; quiz 49-50.
125. Schmidt-Kastner, R. and T. F. Freund (1991). "Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia." Neuroscience **40**(3): 599-636.
126. Schmued, L. C., C. C. Stowers, A. C. Scallet and L. Xu (2005). "Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons." Brain Res **1035**(1): 24-31.
127. Shors, T. J. and L. D. Matzel (1997). "Long-term potentiation: what's learning got to do with it?" Behav Brain Sci **20**(4): 597-614; discussion 614-555.
128. Siesjo, B. K., B. Hu and T. Kristian (1999). "Is the cell death pathway triggered by the mitochondrion or the endoplasmic reticulum?" J Cereb Blood Flow Metab **19**(1): 19-26.
129. Siller-Matula, J. M. and B. Jilma (2008). "Strain differences in toxic effects of long-lasting isoflurane anaesthesia between Wistar rats and Sprague Dawley rats." Food Chem Toxicol **46**(11): 3550-3552.
130. Storey, E., N. W. Kowall, S. F. Finn, M. F. Mazurek and M. F. Beal (1992). "The cortical lesion of Huntington's disease: further neurochemical characterization, and reproduction of some of the histological and neurochemical features by N-methyl-D-aspartate lesions of rat cortex." Ann Neurol **32**(4): 526-534.
131. Strauss, E. B., D. E. Sands, A. M. Robinson, W. J. Tindall and W. A. Stevenson (1952). "Use of dehydroisoandrosterone in psychiatric treatment; a preliminary survey." Br Med J **2**(4775): 64-66.

132. Sudlow, C. L. and C. P. Warlow (1997). "Comparable studies of the incidence of stroke and its pathological types: results from an international collaboration. International Stroke Incidence Collaboration." Stroke **28**(3): 491-499.
133. Suzuki, H., T. Nagashima, N. Tamaki and T. Yamadori (1998). "Cerebral ischemia affects glucose transporter kinetics across rat brain microvascular endothelium: quantitative analysis by an in situ brain perfusion method." Surg Neurol **49**(1): 67-76.
134. Szatkowski, M., B. Barbour and D. Attwell (1990). "Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake." Nature **348**(6300): 443-446.
135. Teichberg, V. I., K. Cohen-Kashi-Malina, I. Cooper and A. Zlotnik (2009). "Homeostasis of glutamate in brain fluids: an accelerated brain-to-blood efflux of excess glutamate is produced by blood glutamate scavenging and offers protection from neuropathologies." Neuroscience **158**(1): 301-308.
136. Tsuchiya, M., K. Sako, S. Yura and Y. Yonemasu (1992). "Cerebral blood flow and histopathological changes following permanent bilateral carotid artery ligation in Wistar rats." Exp Brain Res **89**(1): 87-92.
137. Uluc, K., A. Miranpuri, G. C. Kujoth, E. Akture and M. K. Baskaya (2011). "Focal cerebral ischemia model by endovascular suture occlusion of the middle cerebral artery in the rat." J Vis Exp(48).
138. Valdez, S. R., M. M. Bonafede, N. B. Carreno, R. P. Deis and G. A. Jahn (2012). "Lactation deficit in OFA hr/hr rats may be caused by differential sensitivity to stress compared with Wistar and Sprague Dawley rats." Stress **15**(4): 361-377.
139. Van Wylen, D. G., T. S. Park, R. Rubio and R. M. Berne (1986). "Increases in cerebral interstitial fluid adenosine concentration during hypoxia, local potassium infusion, and ischemia." J Cereb Blood Flow Metab **6**(5): 522-528.
140. Vered, M., A. Bar-Joseph, L. Belayev, Y. Berkovich and A. Biegon (1994). "Anti-ischemia activity of HU-211, a non-psychotropic synthetic cannabinoid." Acta Neurochir Suppl (Wien) **60**: 335-337.
141. Vespa, P., M. Prins, E. Ronne-Engstrom, M. Caron, E. Shalmon, D. A. Hovda, N. A. Martin and D. P. Becker (1998). "Increase in extracellular glutamate caused by reduced cerebral perfusion pressure and seizures after human traumatic brain injury: a microdialysis study." J Neurosurg **89**(6): 971-982.
142. Vijn, P. C. and J. R. Sneyd (1998). "I.v. anaesthesia and EEG burst suppression in rats: bolus injections and closed-loop infusions." Br J Anaesth **81**(3): 415-421.
143. Walberer, M., E. Stolz, C. Muller, C. Friedrich, C. Rottger, F. Blaes, M. Kaps, M. Fisher, G. Bachmann and T. Gerriets (2006). "Experimental stroke: ischaemic lesion volume and oedema formation differ among rat strains (a comparison between Wistar and Sprague-Dawley rats using MRI)." Lab Anim **40**(1): 1-8.
144. Walker, F. R., S. Naicker, M. Hinwood, N. Dunn and T. A. Day (2009). "Strain differences in coping behaviour, novelty seeking behaviour, and susceptibility to socially conditioned fear: a comparison between Wistar and Sprague Dawley rats." Stress **12**(6): 507-516.
145. Watson, B. D., W. D. Dietrich, R. Busto, M. S. Wachtel and M. D. Ginsberg (1985). "Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis." Ann Neurol **17**(5): 497-504.
146. Went István (1962). "Élettan" Medicina Könyvkiadó, Budapest, 1962.
147. Wolman, M., I. Klatzo, E. Chui, F. Wilmes, K. Nishimoto, K. Fujiwara and M. Spatz (1981). "Evaluation of the dye-protein tracers in pathophysiology of the blood-brain barrier." Acta Neuropathol **54**(1): 55-61.

148. Xue, D., Z. G. Huang, K. E. Smith and A. M. Buchan (1992). "Immediate or delayed mild hypothermia prevents focal cerebral infarction." Brain Res **587**(1): 66-72.
149. Yoshida, F., S. Sadoshima, K. Fujii, K. Iino and M. Fujishima (1988). "Regional cerebral blood flow in chronic stroke patients with dementia." Jpn J Med **27**(2): 172-176.
150. Zádor, Z., Z. Lacza, Z. Benyó, T. Harkány and T. Hortobágyi (2003). "Apoptosis in focal brain ischaemia." Clin Neurosci **56**(7-8): 216-228.
151. Zauner, A., R. Bullock, A. J. Kuta, J. Woodward and H. F. Young (1996). "Glutamate release and cerebral blood flow after severe human head injury." Acta Neurochir Suppl **67**: 40-44.
152. Zhang, L., B. Li, W. Ma, J. L. Barker, Y. H. Chang, W. Zhao and D. R. Rubinow (2002). "Dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulfated derivative (DHEAS) regulate apoptosis during neurogenesis by triggering the Akt signaling pathway in opposing ways." Brain Res Mol Brain Res **98**(1-2): 58-66.
153. Zhang, X., M. Qiu, X. Zhang, J. Zhang, H. Zhang and D. Kang (1998). "Excitatory amino acids in cerebrospinal fluid and their relations with clinical features and outcomes in acute head injury." Chin Med J (Engl) **111**(11): 978-981.
154. Zhao, Y. N., J. M. Li, L. Liu, X. Y. Chang, C. X. Chen and S. X. Li (2012). "[Role of endoplasmic reticulum stress-related molecule GRP78 in global cerebral ischemia-reperfusion injury aggravated by hypertension in rats]." Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao **32**(11): 1675-1679.
155. Zhou, A. M., W. B. Li, Q. J. Li, H. Q. Liu, R. F. Feng and H. G. Zhao (2004). "A short cerebral ischemic preconditioning up-regulates adenosine receptors in the hippocampal CA1 region of rats." Neurosci Res **48**(4): 397-404.
156. Zlotnik, A., S. E. Gruenbaum, A. A. Artru, I. Rozet, M. Dubilet, S. Tkachov, E. Brotfain, Y. Klin, Y. Shapira and V. I. Teichberg (2009). "The neuroprotective effects of oxaloacetate in closed head injury in rats is mediated by its blood glutamate scavenging activity: evidence from the use of maleate." J Neurosurg Anesthesiol **21**(3): 235-241.
157. Zlotnik, A., B. Gurevich, S. Tkachov, I. Maoz, Y. Shapira and V. I. Teichberg (2007). "Brain neuroprotection by scavenging blood glutamate." Exp Neurol **203**(1): 213-220.
158. Zlotnik, A., A. Leibowitz, B. Gurevich, S. Ohayon, M. Boyko, M. Klein, B. Knyazer, Y. Shapira and V. I. Teichberg (2012). "Effect of estrogens on blood glutamate levels in relation to neurological outcome after TBI in male rats." Intensive Care Med **38**(1): 137-144.

Tudományos közlemények jegyzéke

Publikációk:

Neuroscience 2012 Oct 25. pii: S0306-4522(12)01057-3. **IF: 3,380**

Fundamental interstrain differences in cortical activity between Wistar and Sprague-Dawley rats during global ischemia

Fuzik J.; Gellért L.; Oláh G.; Kocsis K.; Knapp L.; Nagy D., Z Kincses T.Z., Kis Zs., Farkas T., Toldi J.

Neuropharmacology 2011 Oct-Nov;61(5-6):1026-32. **IF: 4,677**

Kainate postconditioning restores LTP in ischemic hippocampal CA1: Onset-dependent second pathophysiological stress.

Nagy D., Kocsis K., **Fuzik J.**, Marosi M., Kis Z., Teichberg VI., Toldi J., Farkas T.

European Journal of Pharmacology 2011 Sep 30;667(1-3):182-7. **IF: 2,587**

Neuroprotection with a new kynurenic acid analog in the four-vessel occlusion model of ischemia.

Gellért L., **Fuzik J.**, Göblös A., Sárközi K., Marosi M., Kis Z., Farkas T., Szatmári I., Fülöp F., Vécsei L., Toldi J.

European Journal of Pharmacology 2009 Feb 14;604(1-3):51-7. **IF: 2,587**

Oxaloacetate restores the long-term potentiation impaired in rat hippocampus CA1 region by 2-vessel occlusion

Marosi M., **Fuzik J.**, Nagy D., Rákos G., Kis Z., Vécsei L., Toldi J., Ruban-Matuzani A., Teichberg VI., Farkas T.

Poszterek:

8th World Congress of IBRO (2011) Poster C103.

Combined oxaloacetate mediated glutamate scavenging and dehydroepiandrosterone treatment decreases neuronal loss and restores impaired synaptic plasticity after ischemic stroke

J. Fuzik, M. Marosi, L. Knapp, G. Oláh, D. Nagy, L. Gellért, K. Kocsis, T. Farkas and J. Toldi

FAME Conference (2011)

Kainate postconditioning restores LTP in ischemic hippocampal CA1: onset-dependent second pathophysiological stress.

Farkas T, Nagy D, Kocsis K, **Fuzik J.**, Marosi M, Kis Z, Toldi J

XIII. Conference of the Hungarian Neuroscience Society (2011) Poster P4.27.

Postconditioning with kainate restores LTP function in rat hippocampus after ischemic injury

Kocsis, K.; Nagy, D.; **Fuzik, J.**; Knapp, L.; Oláh, G.; Farkas, T.; Toldi, J.

IBRO International Workshop (2010) Poster P3-22.

Kainate postconditioning protects against neuronal dysfunction after global hypoperfusion in rat hippocampus

D. Nagy, M. Marosi, **J. Fuzik**, K. Kocsis, P. Antal, L. Knapp, T. Farkas, Zs. Kis, J. Toldi

6th International Symposium on Experimental and Clinical Neurobiology (2008)
Poster 4.

Oxaloacetate restores the long-term potentiation impaired in rat hippocampus CA1 region by 2-vessel occlusion

Marosi M., **Fuzik J.**, Nagy D., Rákos G., Kis Z., Farkas T., Teichberg V.I., Toldi J.

IBRO International Workshop on Complex Neuronal Networks (2008)

Poster 144.

Oxaloacetate is efficient in recovering ischemia-induced impairment of long-term potentiation in rat hippocampal CA1 region

Marosi M., **Fuzik J.**, Nagy D., Rákos G., Kis Z., Farkas T and Toldi J